VERGLEICH DER Ca^{2+} — UND Mg^{2+} —BINDUNG DER KANINCHEN—SKELETTMUSKEL—TROPONIN—KOMPLEXE P^1TI_2C UND TI_2C UND DEREN BINDUNG AN TROPOMYOSIN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften der Abteilung
für Chemie an der Ruhr-Universität
Bochum

von

ULRIKE JAHNKE

aus Sprockhövel

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544708_0041

VERGLEICH DER Ca^{2+}- UND Mg^{2+}-BINDUNG DER KANINCHEN-SKELETTMUSKEL-TROPONIN-KOMPLEXE P^1TI_2C UND TI_2C UND DEREN BINDUNG AN TROPOMYOSIN

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften der Abteilung
für Chemie an der Ruhr-Universität
Bochum

von

ULRIKE JAHNKE

aus Sprockhövel

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern

Herrn Professor Dr. L.M.G. Heilmeyer jr. danke ich für die Überlassung des Themas, ferner für die Anleitung und Betreuung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Schnackerz und Herrn Dr. Klein bin ich für die Unterstützung bei der Durchführung der ^{31}P-NMR-Spektroskopie zu Dank verpflichtet.

Frau Dr. Schacknies und Herrn Korte danke ich für die Unterstützung bei den Ultrazentrifugationsläufen.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern unseres Hauses, die durch ihre Unterstützung an der Entstehung dieser Arbeit mitwirkten.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Zeitschriften veröffentlicht :

J.E. Sperling, K. Feldmann, H. Meyer, U. Jahnke und L.M.G. Heilmeyer jr. (1979)

Eur. J. Biochem. 101, 581

L.M.G. Heilmeyer jr., U. Jahnke, M.W. Kilimann, K.P. Kohse J.E. Sperling und M. Varsányi (1980)

BioSystems 12, 317

L.M.G. Heilmeyer jr., U. Gröschel-Stewart, U. Jahnke, M.W. Kilimann, K.P. Kohse und M. Varsányi (1980)

Adv. Enzyme Regul. 18, 121

U. Jahnke und L.M.G. Heilmeyer jr. (1980)

Eur. J. Biochem. 111, 325

INHALT

1.	Einleitung	1
2.	Methoden	
2.1.	Präparativer Teil	
2.1.1.	Troponin-Präparation	8
2.1.2.	Herstellung von Casein-Sepharose	9
2.1.3.	Isolierung von Tropomyosin	1o
2.1.4.	Herstellung von dephosphoryliertem Troponin	11
2.1.5.	Abtrennung von I_2C von P^1TI_2C	12
2.1.6.	Herstellung von Puffern mit bestimmten freien Ca^{2+}-Gehalt	12
2.2.	Analytischer Teil	
2.2.1.	Gel-Elektrophorese nach Weber und Osborn ..	13
2.2.2.	Proteinbestimmung nach Lowry	14
2.2.3.	Bestimmung des Phosphatgehalts des Troponins	15
2.2.4.	Stabilitätstest für Troponin	15
2.2.5.	Angaben zur Messung der ^{31}P-NMR	16
2.2.6.	Angaben zur Messung der Radioaktivität	16
2.2.7.	Gelfiltrations-Bindungsmessungen	17
2.2.8.	Gleichgewichtsdialyse	18
2.2.9.	Druckdialyse	2o
2.2.1o.	Bestimmung von Ca^{2+} und Mg^{2+}	2o

2.2.11. Test auf Puffergehalt bei hohen Proteinkonzentrationen 21

2.2.12. Test auf Einstellen des Gleichgewichts bei der Gelfiltrations-Bindungsmessung 22

2.2.13. Viskosimetrie 23

2.2.14. Ultrazentrifugations-Sedimentations-Läufe 23

2.2.15. Bestimmung der Dichte der verwendeten Lösungen 24

2.3. Mathematischer Teil

2.3.1. Programm COMICS 25

2.3.2. Programm RATE 27

2.3.3. Programm ASSAM 28

2.3.4. Viskosimetrieauswertung 30

2.3.5. Auswertung der Ultrazentrifugations-Läufe

2.3.5.1. Programm SUZIE 34

2.3.5.2. Normierung auf Standardbedingungen 34

2.3.6. Kombination der s-Werte mit den aus der Viskosimetrie erhaltenen Daten 36

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Troponin-Komplexe

3.1.1. Phosphatgehalt der Troponin-Komplexe 38

3.1.2. Stabilität der Komplexe P^1TI_2C und TI_2C 39

3.1.3. ^{31}P-NMR-Spektren der Komplexe P^1TI_2C und TI_2C 39

3.2. Grundlagen für die Bindungsmessungen

3.2.1. Optimaler Meßbereich der Metallionenkonzentration 43

3.2.2. Optimierung des Puffers für die Gelfiltrations-Bindungsmessung 49

3.2.3. Einstellen des Ca^{2+}/Mg^{2+}-Troponin-Gleichgewichtes bei der Gelfiltration 51

3.2.4. Einstellen des Ca^{2+}/Mg^{2+}-Troponin-Gleichgewichtes in der Dialysezelle 58

3.2.5. Ca^{2+}/Mg^{2+}-Bindungsmessung bei der Druckdialyse 59

3.2.6. Verdrängung des Puffers bei hoher Proteinkonzentration 6o

3.2.7. Einfluß von EGTA auf die Metallionen-Bindungsraten 6o

3.3. Ca^{2+}-Bindung an die Troponin-Komplexe

3.3.1. Ca^{2+}-Bindung an P^1TI_2C und TI_2C bei niederer Mg^{2+}-Konzentration 61

3.3.2. Ca^{2+}-Bindung an P^1TI_2C und TI_2C bei mittlerer Mg^{2+}-Konzentration 61

3.3.3. Ca^{2+}-Bindung an P^1TI_2C und TI_2C bei hoher Mg^{2+}-Konzentration 62

3.4. Mg^{2+}-Bindung an die Troponin-Komplexe

3.4.1. Mg^{2+}-Bindung an P^1TI_2C und TI_2C bei niederer Ca^{2+}-Konzentration 67

3.4.2. Mg^{2+}-Bindung an P^1TI_2C und TI_2C bei hoher Ca^{2+}-Konzentration 68

3.5. Viskosimetrie

3.5.1. Viskosität der einzelnen Troponin-Komplexe und Tropomyosin 72

3.5.2. Titration von Tropomyosin mit P^1TI_2C 75

3.5.3. Viskosität eines 1:1-Gemisches von Troponin und Tropomyosin in Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration 78

3.6. Sedimentationskonstanten von P^1TI_2C, TI_2C, Tropomyosin sowie die der möglichen Komplexe 87

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung der Troponin-Komplexe P^1TI_2C und TI_2C 96

4.2. Einfluß des Serin-Phosphates des Troponin T auf die Ca^{2+}-Bindung 99

4.3. Einfluß des Serin-Phosphates des Troponin T auf die Mg^{2+}-Bindung 101

4.4. Mg^{2+}-Einfluß auf die hoch affinen Ca^{2+}-Bindungsseiten, allosterischer Effekt oder Kompetition ? 106

4.5. Verhalten der Troponin-Spezies bei der Komplexbildung mit Tropomyosin 112

5. Zusammenfassung 126

6. Literatur 129

7. Anhang: Texte der verwendeten FORTRAN-Programme in alphabetischer Reihenfolge 142

Liste der verwendeten Abkürzungen

ANSA	1-Amino-2-hydroxy-naphthalin-sulfonsäure-(4)
C	Variationskoeffizient in %
cAMP	cyclisches Adenosin-3'5' monophosphat
EDTA	Äthylen-diamin-tetra-acetat
EGTA	Äthylenglycol-bis-(ß-Aminoäthyläther)-N,N'-tetra-acetat
HA	hoch affine Ca^{2+}/Mg^{2+}-Bindungsstelle (bezogen auf P^1TI_2C)
h	Stunde
K_a	Assoziationskonstante
$K_{0.5}$	Dissoziationskonstante
n_H	Hill-Koeffizient
ME	ß-Mercaptoäthanol
M_r	Molekulargewicht
N	Metallion-Bindungsstelle
NA	niedrig affine Bindungsstelle (bezogen auf P^1TI_2C
O.D.	optische Dichte
P^1TI_2C	am endständigen Serin des TnT phosphoryliertes Troponin
r	Bindungsrate
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tm	Tropomyosin
Tn	Troponin
TI_2C	dephosphoryliertes Troponin
TnC	Ca^{2+}-bindende Untereinheit des Troponins
TnI	Aktin-bindende Untereinheit des Troponins
TnT	Tropomyosin-bindende Untereinheit des Troponins
Upm	Umdrehung pro min

1. Einleitung

Viele kontraktile Einheiten, die Sarkomere, bilden die Myofibrillen (1) die Grundeinheit der Muskelfaser. Ein Sarkomer besteht aus dicken und dünnen Filamenten, die sich bei Kontraktion kammartig ineinanderschieben (2). Das dicke Filament enthält hauptsächlich Myosin (Molgewicht 475 ooo) (3, 4) das dünne Filament zum größten Teil aus Aktin, das ein Molekulargewicht von 42 ooo aufweist (5, 6). Auf je 7 Aktin-Moleküle kommt ein Molekül Tropomyosin und Troponin (7). Tropomyosin ist ein langgestrecktes Molekül, das aus zwei gleich schweren Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 35 ooo aufgebaut ist (8).

Troponin besteht aus 3 verschiedenen Untereinheiten, aus der Tropomyosin bindenden Untereinheit Troponin T (Molgewicht 3o 5oo) (9 - 12), aus zwei ans Aktin bindende Einheiten Troponin I (13) (Molgewicht 2o 9oo) (13 - 16) , deren Name daher stammt, daß durch die Bindung die Aktomyosin-ATPase gehemmt wird, und aus dem Troponin C, der Ca^{2+}-bindenden Einheit (Molgewicht 17 9oo)(17-21) .

Die Ca^{2+}-Konzentration im ruhenden Muskel wird durch das sarkoplasmatische Retikulum, ein intrazelluläres Membransystem, mit Hilfe einer Ca^{2+}-Transport-ATPase auf ca. $1o^{-8}M$ gehalten. Auf Grund eines nervösen Impulses steigt die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration. Dieser Ca^{2+}-Konzentrationsanstieg löst die Kontraktion aus (22, 23). Das Aktin und das Myosin bilden die Aktomyosin-ATPase, die durch Hydrolyse des ATP die Energie für die Kontraktion liefert (24). Die Ca^{2+}-Sensitivität der ATPase wird über das Troponin vermittelt. Dabei hemmt bei niederer Ca^{2+}-Konzentration das Troponin I die ATPase, bei hoher Ca^{2+}-Konzentration wird durch das Troponin C die inhibierende Wirkung des Troponin I aufgehoben. Das Troponin C macht dabei eine Konformationsänderung durch (25 - 28),die wiederum eine Konformationsänderung des Troponin I und des Troponin T bewirkt (13, 29).
Nach Hitchcock et al. (71) bindet Troponin I + C ohne die Tropomyosin bindende Untereinheit bei Abwesenheit von Ca^{2+} an das Aktin-Tropomyosin-Filament. Diese Bindung wird gelöst durch Zugabe von $1o^{-5}M$ Ca^{2+}. Daraus entwickelte sich das „two-site-model" , nach dem das intakte Troponin einmal über die Bindung des Troponin T an das Tropomyosin permanent am Filament gehalten wird, ein andermal durch

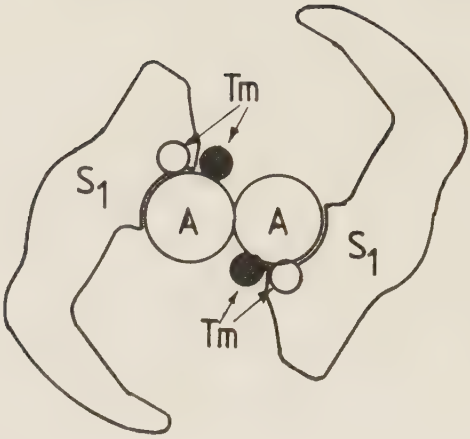
die Ca^{2+}-sensitive Bindung in Abwesenheit von Ca^{2+} über das Troponin I an den Aktin-Tropomyosin - Komplex gebunden wird. Durch diese Bindung wird das Tropomyosin in eine Position geschoben, in der die Komplexbildung des Aktins mit dem Myosin verhindert wird (3o) (Tafel I).

Isoliertes Troponin von Kaninchenmuskeln enthält 1 mol Phosphat pro mol Troponin, das an Serin-1 der Tropomyosin bindenden Untereinheit gebunden ist (13, 32). Troponin T und Troponin I können zusätzlich phosphoryliert werden (33-4o); eine Ca^{2+}-abhängige Protein-Kinase kann ein zusätzliches mol Phosphat bei $1o^{-5}$M Ca^{2+} ins Troponin T einbauen, wohingegen bei $1o^{-8}$M Ca^{2+} der Einbau ins Troponin I erfolgt (13).

In vivo konnte die Phosphorylierung des Troponin I am Herzmuskel gezeigt werden (41), aber nicht im Skelettmuskel des Frosches. In diesem konnte jedoch Troponin T-Phosphorylierung nachgewiesen werden (42).

In den meisten Proteinen ändert die Phosphorylierung einer Aminosäure dessen Eigenschaften, so z.B. wird die Phosphorylase durch Phosphorylierung aktiviert, die Glykogen-Synthase inhibiert.

Tafel I



Querschnitt durch das dünne Filament nach Huxley (2)

A = Aktin
S_1 = S_1- Untereinheit des Myosins
Tm = Tropomyosin,
weiß : Position im ruhenden Muskel
schwarz : Position im aktiven Muskel

Möglicherweise beeinflußt die Phosphorylierung des Troponinkomplexes ebenfalls die Kontraktilität des Muskels; dazu müßte definiert phosphorylierte Troponin-Komplexe näher charakterisiert werden.

Im Fall des Herzmuskels fanden Rubio et. al. (43), daß die Phosphorylierung des Troponin I die Ca^{2+}-Sensivität einer rekonstituierten Aktomysin-ATPase erhöht, jedoch fanden Cole et. al. (41) das Gegenteil.

Schon 1974 versuchten Lallemant et. al.(35) ,die biologische Funktion des endogenen Phosphats des Kaninchen-Skelettmuskel-Troponins zu bestimmen. Dieses hat einen niedrigen Turnover: es wird in jeder Präparation gefunden (44) und die in der Muskelfaser vorhandene Phosphorylase-Phosphatase ist nicht in der Lage, isoliertes Troponin zu dephosphorylieren (44). Dagegen ist alkalische Phosphatase aus Kälberdarm,ein Verdauungsenzym, in der Lage, Kaninchen-Skelettmuskel-Troponin zu dephosphorylieren (34). Dies könnte ein Hinweis sein,daß das endogene Phosphat die Struktur des Proteins stabilisiert. Der dephosphorylierte Troponin-Komplex regulierte aber ebenso wie der native Komplex eine rekonstituierte Aktomysin-ATPase (35). Jedoch wurde das eingesetzte Troponin möglicherweise

durch endogene Proteasen angedaut (13), so daß der das Serin-Phosphat tragende Teil des TnT für die Rekonstitution nicht mehr zur Verfügung stand (44).

Mit dem von uns ausgearbeiteten Verfahren zur Herstellung von Troponin (14) war es zum erstenmal möglich, Troponin zu dephosphorylieren, ohne daß im Inkubationsansatz ein proteolytischer Abbau dieses Proteins auftrat. Die beiden Troponin-Komplexe P^1TI_2C und TI_2C konnten in der vorliegenden Arbeit somit direkt verglichen werden in der Erwartung, der Aufklärung der Funktion des endogenen Phosphats des Kaninchen-Skelettmuskel-Troponins näherzukommen.

Dazu wurden im ersten Teil die Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Bindungseigenschaften dieser Troponin-Spezies verglichen. Hier konnte nachgewiesen werden, daß die Phosphorylierung des Serin -1 am TnT die Ca^{2+}/Mg^{2+}-Bindungsdomänen des TnC beeinflußt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Viskosimetrie und der Ultrazentrifugation die Komplexbildung des Troponins mit Tropomyosin in Abhängigkeit von der Metallionenbesetzung der Troponin-Spezies verfolgt.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten (. 2), daß das Tropomyosin im ruhenden Muskel einen engen Kontakt mit dem Aktin eingeht,während es im aktiven Muskel weiter

in die Rinne gezogen wird, die die Aktin-Helix bildet (vgl. Tafel 1), um es so dem Aktin zu erlauben, Myosin zu binden. In der vorliegenden Dissertation konnten zwei verschiedene Troponin-Tropomyosin-Komplexe aufgezeigt werden, die sich, je nach Ca^{2+}-und Mg^{2+}-Besetzung , ineinander umwandeln. Mit diesen beiden Troponin-Tropomyosin-Komplexen ließ sich ein Modell aufstellen, das die Bewegung des Tropomyosins bei Aktivierung des Muskels nach Erhöhen des Ca^{2+}-Spiegels in der Muskelzelle erklärt.

2. Methoden

2. 1. Präparativer Teil

2. 1. 1. Präparation von 1-Phospho-Troponin

Die Troponin-Präparation folgte einer modifizierten Methode des von Ebashi et al. (45) angegebenen Verfahrens. Alle Präparationsschritte wurden in der Kühlzelle bei $4^{o}C$ oder im Eisbad durchgeführt.

Ca. 1 kg Kaninchen-Skelettmuskel wurden im Fleischwolf zerkleinert und mit 3 l Guba-Straub-Lösung (o.3 M KCl / o.1 M KH_2PO_4/ o.o5 M K_2HPO_4) 1/2 Stunde lang gerührt,der Muskelbrei anschließend 2o min bei 15 ooo g abzentrifugiert und der Niederschlag mit 2 l Guba-Straub-Lösung gewaschen. Anschließend wurde er mit 3 l 2 mM KCl/o.2 mM $KHCO_3$ 1/4 Stunde lang gerührt und 3 mal mit je 2 l destilliertem Wasser gewaschen.

Der so behandelte Muskelbrei wurde mit einem halben Volumen einer 1.2 M LiCl-Lösung aufgeschlämmt und bei 15 ooo g abzentrifugiert,mit dem gleichen Volumen o.4 M LiCl-lösung 2 Stunden lang extrahiert und der pH des Breies gleichzeitig mit 1N HCl langsam auf 4.5 eingestellt. Die Aufschlämmung wurde anschließend 2o min bei 15 ooo g zentrifugiert, der Überstand durch Glaswolle filtriert und mit $NaHCO_3$ auf pH 7.2 gebracht.

Das so erhaltene Rohtroponin wurde nun durch Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung auf 46% Ammoniumsulfatsättigung gebracht und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf 54% Ammoniumsulfatsättigung gebracht und das ausgefallene Troponin nach Zentrifugation bei 15 000 g gegen 0.4 M LiCl/30% Ammoniumsulfatsättigung dialysiert. Anschließend wurde es auf eine 5 x 50 cm Casein-Sepharose-Säule gegeben, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war. Unter diesen Bedingungen wurde das Troponin an das Gel adsorbiert. Nach Waschen mit 1.5 Säulenvolumen des Aufgabepuffers wurde ein Ammoniumsulfatgradient von 30% nach 0% angelegt. Bei 28% Ammoniumsulfatsättigung wurde das Troponin von der Säule eluiert. Die Ausbeute betrug ca.0.5 g.

2. 1. 2. Herstellung der Casein-Sepharose

100 g trockengesaugte Sepharose 4B wurde 4 mal mit destilliertem Wasser gewaschen und in 400 ml destilliertem Wasser suspendiert und 10 g festes BrCN zugegeben. Die Mischung wurde mit 2N NaOH auf pH 11 gebracht und 15 min bei diesem pH gehalten, dann wurde die Reaktion durch Waschen mit kaltem Wasser gestoppt. Die aktivierte Sepharose wurde dann mit 0.5 g Casein in 150 ml 0. 1 M $NaHCO_3$-Puffer pH 7.5 versetzt und 1 Tag bei 4°C gerührt,

anschließend wurde die Reaktion wiederum mit Eiswasser gestoppt, die Sepharose abgesaugt und in 15o ml 1 M Äthanolamin/HCl pH8 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die fertige Casein-Sepharose wurde danach mit o.o1 N NaOH,1 M NaCl-Lösung und destilliertem Wasser gewaschen.

2. 1. 3. Isolierung von Tropomyosin

Ca. 1 kg Kaninchen-Skelettmuskel wurden im Fleischwolf zerhackt und im Waring Blendor mit dem gleichen Volumen Wasser homogenisiert. Das Wasser wurde nach 3o min mit einem Tuch abgepreßt und der Rückstand mit gleichem Volumen 96% Athanol, mit 4 Volumen 5o% Athanol und noch 2 mal mit dem 4fachen Volumen 96% Äthanol gewaschen. Danach wurde 2 mal mit dem gleichen Volumen Äther versetzt, 1o min gerührt und die Flüssigkeit mit einem Tuch abgepreßt. Die Fasern wurden zerkleinert und bei Raumtemperatur 2 - 3 Stunden an der Luft getrocknet . Die Trockenfasern wurden anschließend in 1 l 1 M KCl aufgeschlämmt, mit 1 N NaOH am Autotitrator auf pH 7 gebracht und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und erneut 1 Stunde mit der gleichen Menge 1 M KCl extrahiert. Die Überstände wurden vereinigt und mit 1 N HCl auf pH 4.3 gebracht, 1 Stunde gerührt und das ausgefallene Tropomyosin

abzentrifugiert. Anschließend wurde es in 5 Volumen Wasser aufgenommen und am Autotitrator mit 1 M NaOH auf pH 7 gebracht, über Nacht gerührt und durch Glaswolle filtriert. Das Tropomyosin wurde auf 41 % Ammoniumsulfatsättigung gebracht und der entstandene Niederschlag bei 2o ooo g abzentrifugiert. Anschließend wurde die Ammoniumsulfatsättigung im Überstand auf 7o % eingestellt, das gefällte Tropomyosin abzentrifugiert und gegen o.5 M LiCl/4o% gesättigte Ammoniumsulfatlösung pH 6.9 dialysiert. Dann wurde es auf eine 5 x 2o cm große Butyl-Sepharose-Säule gegeben, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war. Unter diesen Bedingungen band das Tropomyosin an das Gel und wurde mit einem Ammoniumsulfatgradienten von 4o% - 2o% eluiert und gegen Wasser dialysiert. Die Ausbeute betrug ca. 1 g.

2. 1. 4. Herstellung von Dephospho-Troponin

3o ml Troponin (ca. 15 mg/ml) wurden mit 3 ml 1 M Glycin pH 1o.5/1o mM MgCl/1 mM ZnCl und mit 1oo µl alkalischer Phosphatase 5 mg/ml versetzt und 2 Stunden bei 3o°C inkubiert. Nach erfolgter Reaktion wurde die Phosphatase auf Sephacryl S 3oo in Gegenwart von o.5 M KCl/1o mM Tris pH wieder abgetrennt.

2. 1. 5. Abtrennung von I_2C* vom Holotroponinkomplex

Das bei der Präparation anfallende Troponin war zum Teil mit I_2C* verunreinigt. Es wurde gegen 1o mM $NaHCO_3$/o.5 M KCl dialysiert und die Verunreinigung durch Fraktionierung auf einer Sephadex ACA-34 Säule mit dem gleichen Puffer abgetrennt.

2. 1. 6. Herstellung von Puffern mit bestimmten freien Ca^{2+}-Gehalts

Alle Arbeitsgänge wurden in Plastikgefäßen durchgeführt, die zunächst mit EGTA und danach mit quarzdestilliertem Wasser, das durch einen Millipore-Filter weiter gereinigt war, gespült worden sind. Als Grundsubstanzen wurden, soweit erhältlich, suprapur-Reagenzien verwendet.

Der Ca^{2+}-Gehalt wurde in Puffern von 5o/uM mit Ca^{2+}-Titrisol eingestellt und der pH anschließend auf den gewünschten Wert eingestellt.

Bei freien Ca^{2+}-Konzentrationen unter 1 /uM wurde eine entsprechende Menge EGTA im Puffer vorgelegt (1o/uM bis 1 mM) und die nach 2. 3. 1. erforderliche Menge an Ca-Tritisol zugegeben.

* I_2C bedeutet hier ein Troponin-Fragment, in dem das TnT durch Hydrolyse entfernt wurde.

2. 2. Analytischer Teil

2. 2. 1. SDS-Gelelektrophorese nach Weber und Osborn (46)

Stammlösungen:

I. 22.2 g Acrylamid und o.6 g Methylen-bis Acrylamid wurden mit Wasser auf 1oo ml aufgefüllt.

II. 6o mg Ammoniumperoxodisulfat wurde in 4 ml Wasser gelöst.

III. 28.5 ml 1 M NaH_2PO_4 , 145 ml o.5 M Na_2HPO_4 und 1o ml 1o % SDS wurden mit Wasser auf 5oo ml aufgefüllt.

Es wurden 1o%ige Gele folgender Zusammensetzung verwendet:

9 ml I. 1ml II. 1o ml III. und 2o /ul Tetramethyl-äthylendiamin

Die Lösungen wurden bis auf die Ammoniumperoxodisulfat-Lösung zusammengegeben und entgast. dann wurde die polymerisationsreaktion durch Zugabe der Lösung II gestartet. Das Gemisch wurde sofort in Glasröhrchen gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach einer Stunde waren die Gele gebrauchsfertig.

Die Elektrophoresekammern wurden mit Kammerpuffer (Lösung III 1:1 verdünnt) gefüllt und das Protein nach Denaturierung bei 1oo°C /5min in 1% SDS. o.o1 M Na_2HPO_4 , 1% ME , 1o% Glycerin und o.oo2% Bromphenolblau auf das Gel aufgetragen (3 - 5 /ug/ Bande), die Elektrophorese bei 8o Volt 2 1/2 Stunden gefahren.

Die Anfärbung des Proteins erfolgte in 625 mg Coomassie-Brillant-Blau in 227 ml 5o% Methanol/ 23 ml Essigsäure 1/2 Stunde bei 6o°C , die Entfärbung erfolgte in 7.5% Essigsäure/5% Methanol.

2. 2. 2. Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (47)

Das Protein wurde mit 1 ml 1o%iger TCA bei o° C gefällt. abzentrifugiert und in 1% SDS/o. 1 N NaOH aufgenommen. 2oo /ul der Probe wurde im Technicon-Auto-Analyzer bei Raumtemperatur mit dem gleichen Volumen o. 1% $CuSO_4$ x 5 H_2O/ o.24% Dinatriumtartrat x 2 H_2O , pH 7.o versetzt.Nach 1 min. wurde o.85 ml o.2 N NaOH/2. 12% Na_2CO_3 zugegeben,nach einer weiteren Minute o.5 ml Folin-Ciocalteau-Reagenz (Merck, 1 : 4 mit Wasser verdünnt) und 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 66o nm photometriert. Die Eichung erfolgte mit Rinderserumalbumin-Standard-lösungen. Die Ermittlung des Korrekturfaktors für Troponin erfolgte nach SPERLING (44) und betrug 1.11 basierend auf der Zusammensetzung $TnT(TnI)_2TnC$.

2. 2. 3. Bestimmung des Phosphatgehalts des Troponins (48)

Das Troponin wurde 3 mal mit gleichem Volumen 1o% TCA gefällt, abzentrifugiert und in 1oo%iger Ameisensäure aufgenommen, der Proteingehalt bestimmt und auf 3 - 1o mg/ml gebracht.

o.5 - 1 ml der Probe wurde mit o.2 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und bei 16o°C 8 Stunden verkohlt. Um die entstandene Kohle zu CO_2 zu oxidieren, wurde die Probe anschließend mit o.5 - 1.5 ml 3o%iger H_2O_2-Lösung versetzt und das H_2O_2 bei 16o°C 8 Stunden quantitativ verkocht. Nach Auffüllen der Probe auf 1 ml mit Wasser wurde sie mit o.4 ml 2.5% Ammoniummolybdatlösung versetzt und mit 3.4 ml Wasser und o.2 ml ANSA 5 - 1o min bei 1oo°C inkubiert. Die Eichproben und die Blindprobe wurde ebenso behandelt, anschließend wurden die Proben bei 66o nm photometriert.

2. 2. 4. Stabilitätstest Troponin

1o µl Troponin (1o mg/ml) wurden in o.5 ml 5o mM Tris/ 15 mM KCl/4 mM Magnesiumacetat pH 7.5 und für die Bestimmung in Abwesenheit von Ca^{2+} o.2 mM EGTA bei 3o°C inkubiert. Nach 2 Stunden wurden je 5o µl für SDS-Gele (2. 2. 1.) entnommen und aus dem Auftreten der 2ö ooo- oder 14 ooo-M_r-Bande auf proteolytische Aktivitäten geschlossen.

2. 2. 5. Angaben zur Messung der ^{31}P-NMR

Die ^{31}P-NMR- Spektren wurden mit einem Bruker WH 18o Spektrometer bei 72.86 MHz aufgenommen.

Die Proben enthielten ca. 12 mg/ml Troponin, welches gegen 1mM $NaHCO_3$/o.5 M KCl/1 mM ME pH 7.5 dialysiert wurde.

Das Spektrum der Troponin-Komplexe wurde mit einer Impulszeit von o.7 sec und einem Meßzeitraum von 1.7 sec pro Impuls. Die Linienbreite der Fourier-Analyse betrug 3 Hz.

2. 2. 6. Angaben zur Messung der Radioaktivität

Die Messungen wurden in einem Packard Liquid Scintillation Counter Model 245o in folgender Scintillationslösung durchgeführt:

21.84 g 2,5-Diphenyloxazol
2.16 g 1,4-(2-Methylstyryl-) Benzol
in 2 l Toluol (2 : 1 mit Triton X-1oo versetzt)

Die radioaktiven Proben wurden mit 5 ml dieser Lösung versetzt und in Kunststoff - Probenbehältern gemessen.

2. 2. 7. Gelfiltration - Bindungsmessungen (49)

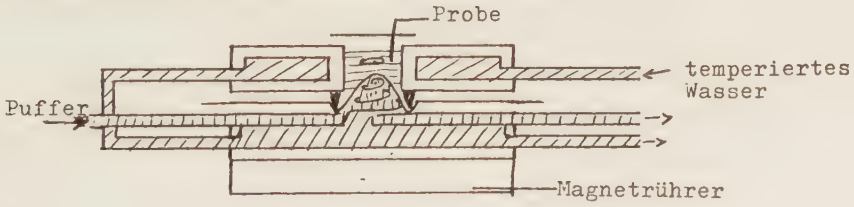
Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 21°C durchgeführt. Eine mit Sephadex G 5o superfine gefüllte Acrylglassäule (o,9 x 25 cm) wurde mit dem gewünschten Puffer voräquilibriert und o.3 bis o.5mg Protein aufgetragen. Anschließend wurde es mit dem gleichen Puffer eluiert. Fraktionen von o.25 ml wurden in Polystyrol-Reagenzgläsern gesammelt und die Proteinkonzentrationen nach 2.2.2. sowie die Ca^{2+}-und Mg^{2+}-Konzentrationen nach 2.2.12. bestimmt. DieElutionsprofile zeigen 2 Gipfel der Metallkonzentration auf einem Plateau, das durch die Voräquilibrierung der Säule bedingt ist. Der erste Gipfel eluiert zusammen mit dem Protein im Ausschlußvolumen der Säule(ca. 3.5 ml) und stellt das proteingebundene Metall dar.
Der Metall-Überschuß der Probe wird abgetrennt und erscheint zusammen mit den übrigen Bestandteilen des Probepuffers im Totalvolumen (ca 9 ml)
Die Konzentration der freien Metallionen im Gleichgewicht mit dem Protein wird durch die Plateaus vor und nach dem 1. Gipfel gegeben. Das proteingebundene Metall wurde berechnet aus der Differenz zwischen der Gesamt-Metallkonzentration in einer proteinhaltigen Fraktion und der Konzentration an freiem Metall. Die Bindungsrate wurde angegeben als Mole gebundenes Metall an Mol Protein.

2. 2. 8. Gleichgewichtsdialyse

Die Gleichgewichtsdialyse wurde in einer Dialysezelle durchgeführt, die folgenden Aufbau hatte:
Der obere Teil bestand aus einem Block,der einen kreisförmigen Ausschnitt hatte.Um diesen Ausschnitt war eine kreisförmige Nute angebracht.Der untere Block besaß an der entsprechenden Stelle eine Rille und in der Mitte eine leicht konische,nach oben offene Schnecke,an deren beiden Enden 2 Röhren nach außen verlegt waren,die in Oliven mündeten. Zwischen den beiden Blöcken befand sich ein passend zurechtgeschnittenes Stück Visking Dialysemembran,das durch das Verschrauben der beiden Blöcke gehalten wurde.Dadurch entstanden 2 Kammern,die obere zylinderförmig,die untere schneckenförmig.Der Konus der Schnecke straffte die Dialysemembran und verhinderte so einen Kurzschluß zwischen den einzelnen Windungen. Die Nute klemmte die Membran ein,sorgte also dafür,daß ihre Spannung erhalten blieb,und wirkte zusätzlich mit der Membran als Dichtung.
Da die Blöcke hohl waren und ihre Innenräume in Oliven mündeten,konnte man sie mit Wasser temperieren.
Das Volumen der oberen Kammer betrug 1 ml,das der unteren o,o3 ml.
In die obere Kammer wurden o,5ml Probe gegeben, zusammen mit einem in Plastik eingegossenen Stück Eisendraht als Rührfisch,durch die untere wurde der Puffer gepumpt mit 4o ml/h.

Die Kammer wurde zum Schutz vor Verdunstung mit Parafilm verschlossen. Durch die untere Kammer pumpte man nun den Dialysepuffer mit ca. 2o ml/h Durchflußgeschwindigkeit.Nach Einstellen des Gleichgewichts zwischen Probe und Probenpuffer wurde ein Aliquot der Probe sowie des Probenpuffers am Auslauf der Schnecke entnommen und auf Metallionen und Protein geprüft.Fand sich im Probenpuffer Protein, mußte die Dialysemembran ersetzt werden, was je nach eingestellter Rührgeschwindigkeit nach 3 - 7 Tagen der Fall war. Nach erfolgter Messung wurde der Probenpuffer gewechselt und nach 7 Tagen auf die Stabilität des Proteins nach 2.2.4. geprüft.

Schematischer Versuchsaufbau:



2. 2. 9. Druckdialyse

Die Druckdialysen wurden in Amiconzellen mit den Dialysemembranen PM 1o bei 2o°C durchgeführt.
1oo mg Protein wurden in 25o ml Probenpuffer 1Stunde lang gerührt,anschließend über mehrere Stufen ankonzentriert (vgl. 2. 2. 12.) und jeweils nach einer Stufe ein Aliquot der Probe und des Durchlaufs auf Protein- und Metallgehalt geprüft, bei Zugabe von radioaktiven Substanzen auch auf Radioaktivität.

2. 2. 1o. Bestimmung von Ca^{2+} und Mg^{2+}

Die Bestimmungen der Metalle wurden mit dem Atomabsorptionssprektrometer FMD 3 von Zeiss durchgeführt.Das Gerät war mit einer Graphitrohrküvette Perkin-Elmer HGA 74 ausgerüstet.Die Aufzeichnung der Meßsignale erfolgte mit einem Hochempfindlichkeitsschreiber(Radiometer REC 61/REA 112).
Bei dem größten Teil der Messungen wurde der automatische Probennehmer Perkin-Elmer AS 1 (Probenvolumen = 2o µl) benutzt.
Wo dieser wegen zu hoher Viskosität der Probelösung versagte,wurde die Probemenge mit einer geeichten Eppendorf-Kolbenpipette in die Graphitrohrküvette eingespritzt.
Die Probe wurde durch einen Temperaturgradienten von 2o°C auf 5oo°C in 11 Sekunden eingedampft,15 Sekunden lang bei 9oo°C zersetzt,um organische Stoffe zu entfernen und anschließend bei 2 7oo°C 1o Sekunden lang atomisiert.

Das Signal der Metallionen erschien im Fall des Mg^{2+} sofort bei Erreichen der Temperatur, im Fall des Ca^{2+} nach ca. 2 Sekunden. Auch reichten die 1o sec. im Fall des Mg^{2+} zum Ausheizen der Küvette, während im Fall des Ca^{2+} bis zu 3o Sekunden nachgeheizt werden mußte. Der maximale Ausschlag ist direkt proportional der Substanzmenge. Die Reproduzierbarkeit der Mg^{2+}- Messung ist nahezu 1oo% in niedrig viskosen Lösungen, die der Ca^{2+}-Messung konnte durch Zugabe von 1o mM $MgCl_2$ von 95% auf ebenfalls nahezu 1oo% gebracht werden.
Um Matrixeffekte soweit wie möglich auszuschalten, wurden möglichst flüchtige Pufferbestandteile gewählt, z.B. 1o mM Imidazol, welches bei 9oo°C zersetzt wird, und zum Einstellen der Ionenstärke Ammoniumchlorid, das bei 35o°C sublimierte. Ca^{2+} wurde gemessen in einem Konzentrationsbereich zwischen 5o nM und 1o/uM , Mg^{2+} zwischen 1o nM und 2/uM.

2. 2. 11. Test auf Puffergehalt bei hohen Proteinkonzentrationen

Bei der Mg^{2+}-Troponin-Bindungskurve wurde es wegen der hohen Mg^{2+}-Konzentration notwendig, hohe Proteinkonzentrationen einzusetzen, um proteingebundenes Mg^{2+} von freiem Mg^{2+} unterscheiden zu können. Dabei verdrängte das Protein den Puffer, so daß an den Bindungsstellen eine geringere Metallionenkonzentration vorlag als im gemessenen Probenpuffer. Um diesen Fehler zu kompensieren, wurden radioaktives Äthanolamin in die Puffer gegeben.

Die Gleichgewichtseinstellung galt als beendet, wenn sich das Radioaktivitätsverhältnis zwischen Probe und Puffer über einen Zeitraum von 3 Stunden nicht änderte. Aus dem Radioaktivitätsverhältnis und der Metallionenkonzentration im Probepuffer konnte dann auf die freie Metallionenkonzentration im Innern der Probe geschlossen werden.

2. 2. 12. Test auf Einstellen des Gleichgewichts bei der Gelfiltration-Bindungsmessung

Die Gelfiltration wurde mit verschiedenen Durchflußgeschwindigkeiten durchgeführt wie in 2. 2. 7. beschrieben.
Als Bindungsrate im Gleichgewicht galt der Wert, der sich nach 15 min nicht mehr ändert.
Weiterhin wurden einzelne Werte der Bindungskurve durch eine 24 - 48 -stündige Gleichgewichtsdialyse nach 2.2.8. überprüft. Als 3. Sicherheit wurde das eingesetzte Troponin einmal vor den Bindungsmessungen gegen einen Überschuß Metallionen, einmal gegen die entsprechenden Komplexoren dialysiert. Fielen die Bindungsraten dieser Versuche zusammen, galt der Wert als gesichert.

2. 2. 13. Viskometrie

Alle viskometrischen Untersuchungen wurden bei 20°C in Ubbelohde-Viskosimetern durchgeführt. Diese wurden vorher mit Wasser geeicht. Die Hagenbach-Korrektur wurde für den jeweiligen Viskosimetertyp und die Laufzeit der beiliegenden Tabelle entnommen. Die Zeit für den Durchlauf der Flüssigkeitsmenge wurde mit dem Viscotimer von Schott gemessen, indem das Passieren des Meniskus durch zwei Lichtschranken gestoppt wurde. Die Auswertung erfolgte nach 2. 3. 3. .

2. 2. 14. Ultrazentrifugations-Sedimentations-Läufe.

Von den Troponin-Komplexen $P^1TI_2^3$, TI_2^3 und Tropomyosin sowie deren Gemisch (1 : 1) wurden Ultrazentrifugations-Sedimentations-Läufe in einer Beckman Ultrazentrifuge Model E gefahren. Die Rotortemperatur betrug 4 - 5°C. Als Rotor wurde ein 2-Loch-Titanrotor An-H Ti oder ein 4-Loch-Titanrotor An-F Ti verwendet.
Es wurde bei Drehzahlen von 44 000 - 56 000 Upm gefahren, was einer g-Zahl von 123 000 - 256 000 entsprechen würde.

Als Zellen wurden bis 48 ooo Upm = 16o ooo g Doppelsektorzellen mit Charcoal-filled-Epon Mittelstücken benutzt, oberhalb dieser Drehzahl Zellen mit Aluminium-Mittelstücken.

Die Probelösung wurde 2 Stunden mit 1.5 M ME bei 35°C inkubiert, um oxidierte SH-Gruppen zu reduzieren, anschließend gegen o.5 M NH_4Cl/ 1o mM Imidazol pH 7.4 mit den entsprechenden Konzentrationen an Ca^{2+}, Mg^{2+} und EGTA dialysiert und gegen den jeweiligen Dialysepuffer gefahren.

Direkt nach Erreichen der Endgeschwindigkeit wurde alle 8 bzw. 16 min das Absorptionsprofil der Probe bei 28o nm in der Zelle gemessen und nach 2.3.5. ausgewertet.

2.2.15. Bestimmung der Dichte der verwendeten Lösungen

Die Dichte der Lösungen wurde bestimmt, indem eine gegebene Volumenmenge mit einer gegen Wasser geeichten Eppendorf-Kolbenpipette auf einer Sartorius-Analysenwaage mehrmals gewogen wurde. Die Standardabweichung der Messungen betrug bei 5o/ul o.4%, bei 2oo/ul o.2% bei jeweils 1o Messungen.

2. 3. Mathematischer Teil

Neben herkömmlichen Plots und Berechnungen wurden mit den unten aufgeführten FORTRAN-Programmen am Großrechner des Rechenzentrums der Ruhr-Universität Bochum die Auswertung der Ergebnisse durchgeführt, zum Teil unter Benutzung von Unterprogrammen aus der Programmbibliothek des Rechenzentrums.

2. 3. 1. Programm COMICS (modifiziert nach Perrin und Sayce) (50)

Zur Berechnung einer Pufferlösung, die verschiedene Metallsalze und Komplexbildner nebeneinander enthält, dient das Programm der Berechnung der Konzentrationen der freien Metallionen und Komplexbildner und ihrer verschiedenen Komplexe einschließlich der protonierten Spezies.Als Daten werden die Gesamtkonzentrationen der Metalle und Komplexoren , der pH, die Zahl und Zusammensetzung der Komplexe und ihre Assoziationskonstanten benötigt. Die Konstanten wurden dem Tabellenwerk von Sillen und Martell (51) entnommen.

Das Programm berechnet die Konzentrationen nach einem iterativen Verfahren.Im ersten Rechengang werden für die freien Metall- und Komplexorkonzentrationen ihre totalen Konzentrationen eingesetzt und auf dieser Grundlage die

Konzentrationen der einzelnen Komplexe aus dem Massenwirkungsgesetz berechnet.

Nun gilt:

$$(1) \qquad (M^i)_t = (M^i) + \sum_{j=1}^{n} c_j P_{i,j}$$

wobei $(M^i)_t$ die totale Konzentration des Metalls i, c_j die Konzentrationen der einzelnen im System vorkommenden Komplexe (Gesamtzahl n) und P_{ij} die Stöchiometrie der in Komplex j gebundenen Ionen des Metalls i bedeuten. Der Rechner ermittelt nun Betrag auf der rechten Seite der obigen Gleichung für jedes Metall, und analog für jeden Komplexor, der mit $(M^i)_t^{calc}$ bezeichnet wird. Die Näherung für (M^i) wird ersetzt durch $(M^i) \cdot ((M^i)_t/(M^i)_t^{calc}) \cdot 1/2$, analog wird für jeden Komplexor verfahren. Das Verfahren wird nun so oft wiederholt, bis alle $(M^i)_t^{calc}$ von den zugehörigen $(M^i)_t$ um weniger als o.o1% abweichen, ebenso die analogen Werte für die Komplexoren. Die so erhaltenen Metallion-, Komplexor- und Komplexkonzentrationen werden in Tabellenform ausgedruckt. Der Text des Programmes und die in dieser Arbeit verwandten Assoziationskonstante sind im Anhang wiedergegeben.

2. 3. 2. Programm RATE

Mit dem Programm RATE ist es möglich, Bindungsparameter an eine von der Hill-Gleichung (52)

$$(2) \quad r = \sum_{i=1}^{N} \frac{n_i . K_i . X^{h_i}}{1 + K_i . X^{h_i}}$$

vorgegebene Kurvenform zu fitten, wobei r die Bindungsrate, N die Anzahl der Bindungsklassen, n_i die maximale Bindungsrate der i-ten Klasse, K_i ihre Hill-Konstante und h_i ihr Hill-Koeffizient ist. ($1/K_{0.5} = \sqrt[h]{K}$)

Das Programm gibt die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten C der mit den eingegebenen Parametern N_i, $K_{0.5,i}$ und h_i berechneten Bindungsraten von den gemessenen Werten an und druckt das jeweilige Bjerrum-Diagramm r/-lgX.

Da die Bindungsparameter in diesem Programm von Hand variiert werden, ist es möglich, anhand des Bjerrum-Diagrammes größere Fehlschätzungen schneller zu korrigieren, als es z.B. bei dem nachfolgend beschriebenen Programm ASSAM der Fall ist.

Das Programm RATE wurde überall dort verwendet, wo Bindungsparameter für eine Ionensorte bestimmt wurden.

2. 3. 3. Programm ASSAM (53)

Dieses Programm wurde angewendet, um Bindungsparameter von kompetierenden Liganden an ein Protein zu bestimmen.

Es basiert auf dem von H.R. Kalbitzer und D. Stehlik aufgestellten Gleichungssystem :

$$(3)\quad r_x = \frac{N_1(K_{a1}X)(K_{a1}X+L_{a1}Y+M_{a1}Z)^{h-1}}{1+(K_{a1}X+L_{a1}Y+M_{a1}Z)^{h}} + \sum_{i=2}^{4} \frac{N_i \cdot K_{ai}X}{1+K_{ai}X+L_{ai}Y+M_{ai}Z}$$

$$(4)\quad r_y = \frac{N_1(L_{a1}Y)(K_{a1}X+L_{a1}Y+K_{a1}Z)^{h-1}}{1+(K_{a1}X+L_{a1}Y+M_{a1}Z)^{h}} + \sum_{i=2}^{4} \frac{N_i \cdot L_{ai}Y}{1+K_{ai}X+L_{ai}Y+M_{ai}Z}$$

$$(5)\quad r_z = \frac{N_1(M_{a1}Z)(K_{a1}X+L_{a1}Y+M_{a1}Z)^{h-1}}{1+(K_{a1}X+L_{a1}Y+M_{a1}Z)^{h}} \sum_{i=2}^{4} \frac{N_i \cdot M_{ai}Z}{1+K_{ai}X+L_{ai}Y+M_{ai}Z}$$

und führt eine nichtlineare Regression auf die abgeleitete Variable r_x/X durch.

Es geht von extern vorgegebenen Anfangsschätzwerten der Parameter N_i, K_{ai}, L_{ai}, M_{ai} und h aus und variiert sie in vorgegebenen Schrittweiten. Nach jeder Parametervariation wird die Summe der Abweichungsquadrate zwischen den gemessenen r_x/X-Werten und denen der Funktion des Zwischenergebnisses errechnet. Die Iteration wird dann in der Richtung weiter fortgesetzt(Ver-

größerung oder Verkleinerung des Parameters), die zu einer Verkleinerung der Fehlerquadratsumme geführt hat. Jedesmal nach Variation des Parametersatzes druckt der Rechner das Zwischenergebnis (Parameter und Fehlerquadratsumme) aus, um nach der vorgegebenen Anzahl der Iterationsschritte abzubrechen.

Dieses Verfahren liefert nur begrenzt ein Maß für die Genauigkeit der ermittelten Parameter. Es verlangt die Kontrolle durch einen erfahrenen Bearbeiter, (Nebenminima lassen die Iteration vorzeitig stagnieren) und die Vorgabe von Anfangsschätzwerten der Parameter. Daher wurde es nur für Probleme eingesetzt, bei denen tatsächlich Kompetition vorlag und das Programm RATE nicht angewendet werden konnte. Der Text des Programms ist im Anhang wiedergegeben.

2. 3. 4. Viskosimetrieauswertung

Bei der Viskosität einer Lösung handelt es sich um die innere Reibung ihrer Bestandteile, d.h. Puffer und Protein.

In den vorliegenden Versuchen wurde diese bestimmt, indem die Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare gemessen wurde. Dabei gilt das Gesetz von Hagen-Poiseuille :

$$(6) \quad \frac{dV}{dt} = \frac{\pi r^4 \, (P_1 - P_2)}{8 \eta l}$$

wobei V das Volumen, t die Zeit, r der Radius der Kapillare, l deren Länge und $(P_1 - P_2)$ die Druckdifferenz zwischen den Enden des Rohres ist. η ist dann die thermodynamische Viskosität der Lösung.

In den verwendeten Viskosimetern ist diese der Dichte der Lösung proportional, es gilt für ein bestimmtes Gesamtvolumen :

$$(7) \quad \nu = \frac{\pi r^4 \cdot \Delta P \cdot t}{8 \cdot l \cdot V} \qquad \text{und } P = h \cdot g \cdot \varrho$$

$$(8) \quad \nu = \frac{\eta}{\varrho} = \frac{\pi r^4 \cdot h \cdot g \cdot t}{8 \cdot l \cdot V}$$

wobei ν die kinematische Viskosität, h die mittlere Höhe der Kapillare und g die Erdbeschleunigung ist. Die Gleichung läßt sich vereinfacht schreiben :

$$(9) \qquad \nu = K \cdot t$$

wobei K als Viskosimeterkonstante bezeichnet wird.
Dieses Gesetz gilt jedoch nur für unendlich lange Kapillaren. Da am Ein- und Auslauf der Kapillare Strömungswiderstände entstehen, muß ein Korrekturglied eingeführt werden :

$$(10) \qquad \nu = K \cdot (t - t_s)$$

t_s nennt man die Hagenbach-Korrektur, sie wird für das jeweilige Viskosimeter tabellarisch angegeben.
Aus der kinematischen Viskosität läßt sich nach Gl. (8) die thermodynamische Viskosität berechnen, die relative Viskosität einer Lösung ergibt sich aus Gl. (11) :

$$(11) \qquad \eta_{rel} = \frac{\eta_{Probe}}{\eta_{Puffer}}$$

die spezifische Viskosität eines Proteins berechnet sich dann aus (12). Dividiert man diese durch die Proteinkonzentration, erhält man die reduzierte Viskosität.

$$(12) \qquad \eta_{sp} = \frac{\eta_{Probe} - \eta_{Puffer}}{\eta_{Puffer}} = \eta_{rel} - 1$$

Da in der vorliegenden Arbeit ein Zwei-Komponenten-Gemisc
untersucht wird, ist es nötig, die spezifische Viskosi-
tät einer Probenmischung herzuleiten:
Es seien P_1 und P_2 die Indices für die Proben 1 und 2,
L der für das Lösungsmittel, dann gilt :

$$(13) \qquad \eta_{sp1} = \frac{\eta_{P1}}{\eta_{L1}} - 1 \text{ und } \quad \eta_{sp2} = \frac{\eta_{P2}}{\eta_{L2}}$$

Unter der Annahme, daß η_{sp} unabhängig vom Lösungsmittel
ist, kann man das Gemisch ansehen als eine Lösung des
Stoffes 2 in der Probe P1. Dann ist L2 = P1 und η_{sp2}
wird zu :

$$(14) \qquad \eta_{sp2} = \frac{\eta_{P2}}{\eta_{P1}} - 1$$

Bringt man die zu messende Werte nach links und mul-
tipliziert Gl. (13) mit Gl. (14), ergibt sich :

$$\frac{\eta_{P2}}{\eta_{P1}} \frac{\eta_{P1}}{\eta_{L1}} = (\eta_{sp2} + 1)(\eta_{sp1} + 1)$$

und damit Gl.(15) :

$$(15) \qquad \frac{\eta_{P2}}{\eta_{L1}} = \eta_{sp2} \cdot \eta_{sp1} + \eta_{sp2} + \eta_{sp1} + 1 = \eta_{sp2+1} + 1$$

und Gl. (16) :

$$(16) \qquad \eta_{sp1+2} = \eta_{sp1} \cdot \eta_{sp2} + \eta_{sp1} + \eta_{sp2}$$

Der 1. Term spiegelt die Wechelwirkung zwischen den Proteinen wieder, der 2. und 3. den Viskositätsbeitrag der einzelnen Komponenten. Unter der Annahme, daß keine Wechelwirkung stattfindet, vereinfacht sich die Gleichung zu: (große Verdünnung)

$$(17) \qquad \eta_{sp1+2} = \eta_{sp1} + \eta_{sp2}$$

Die spezifische Viskosität ist konzentrationsabhängig, die Abhängigkeit gibt die folgende Gleichung wieder: (72)

$$(18) \qquad \eta_{sp} = \frac{a}{M} c_o + \frac{b}{M^2} c_o + \ldots\ldots\ldots$$

Wenn man $\eta_{sp1} = \eta_{sp2}$ setzt, sieht man, daß diese Gleichung identisch ist mit der oben abgeleiteten. Für $c_o \longrightarrow o$ ergibt sich aus der Gleichung die intrinsische Viskosität :

$$(19) \qquad [\eta] = \lim_{c_o \to o} \eta_{sp}/c_o = a/M$$

Nach Einstein ist a proportional dem Volumen der gelösten Proteine, und aus Gl. (19) wird :

$$(20) \qquad [\eta] = 2.5 \cdot (V_h N_I)/M$$

wobei V_h das Volumen des hydratisierten kugeligen Proteins ist. Für Ellipsoide steigt dieser als Simha-Faktor ter bekannte Wert.

2. 3. 5. Auswertung der Ultrazentrifugations-Sedimentations- Läufe

2. 3. 5. 1. Programm SUZIE

Das Fortran-Programm SUZIE basiert auf der Gleichung:

(21) $s = 1/\omega^2 \, (d\ln\bar{x}/dt)$

wobei $\bar{x}$ die Position der Grenzschicht zwischen Lösungsmittel und Probe ist. Da sich $\bar{x}$ unter anderem durch Diffusion verbreitet, wurde entweder die Stelle genommen, an der dc/dx ein Maximum annimmt, oder die Halbstufe eines Konzentrationsprofiles.

Das Programm berechnet die einzelnen Werte für s zwischen je 2 Zeitintervallen, um systematische Fehler aufzuzeigen, sowie einen Gesamtwert aus einer Regressionsgerade $\ln\bar{x}/t$ sowie dessen Standardabweichung für den Fall, daß t korrekt gemessen wurde.

Der Text des Programms ist im Anhang wiedergegeben.

2. 3. 5. 2. Normierung auf Standardbedingungen

Die nach 2. 3. 5. 1. erhaltenen s-Werte wurden nach Gl. (23) auf Standardbedingungen umgerechnet :

(22) $$s_{20,w} = s_T \cdot \frac{\eta_{T,w}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{\eta_{Tx,P}}{\eta_{Tx,w}} \cdot \frac{1 - \bar{v} \cdot \rho_{20,w}}{1 - \bar{v} \cdot \rho_{T,x}}$$

hierbei gilt :

$$(23) \quad \varrho_{T,P} = \frac{\varrho_{Tx,P}}{\varrho_{Tx,w}} \cdot \varrho_{T,w}$$

T ist die Temperatur, bei der der s-Wert bestimmt wurde, Tx eine beliebige Temperatur, der Index P steht für Probe. Da in stark verdünnten Lösungen gearbeitet wurde, um Konzentrationseffekte zurückzudrängen, wurde statt dessen die Dichte und Viskosität des Puffers eingesetzt. Das jeweilige $\bar{v}$ der Proteine wurde aus ihrer Aminosäurezusammensetzung ermittelt ($\bar{v}_{trocken}$).

2. 3. 6. Kombination der s-Werte mit den aus der Viskosimetrie bestimmten Daten

Kombiniert man die Svedberg-Gleichung mit Gl. (2o), erhält man einen Ausdruck mit dem man bei bekannter Symmetrie das Molekulargewicht bestimmen kann.

Aus

$$(24) \quad M = \frac{sRT}{D(1-\bar{v}\varrho)}$$

und

$$(25) \quad D = kT/f$$

ergibt sich

$$(26) \quad M = \frac{s \cdot N_1 \cdot f}{(1 - \bar{v}\varrho)}$$

f ist der Reibungskoeffizient eines Ellipsoids und gegeben durch

$$(27) \quad f = 6\pi\eta \left(\tfrac{3}{4}\pi V_h\right)^{1/3} F$$

V_h ist das Volumen des hydratisierten Proteins, F ist der Perrin'sche Symmetriefaktor; er ist für Kugeln gleich 1.

Aus Gl. (25) und (26) ergibt sich :

$$(28) \quad M = \frac{s \cdot N_1 \cdot 6\pi\eta\,(o.75\pi)^{1/3} \cdot V_h^{1/3} \cdot F}{1 - \bar{v}\varrho}$$

Schreibt man Gl. (2o) um, kann man V_h aus Gl. (28) eliminieren :

$$(29) \quad [\eta] = V_h \cdot N_1 / M \qquad V_h^{1/3} = \left(\frac{[\eta] \cdot M}{\nu \cdot N_1} \right)^{1/3}$$

Faßt man alle Parameter, die Formfaktoren enthalten, zusammen, ergibt sich die Scheraga-Mandelkern-Gleichung :

$$(3o) \quad M = \frac{s \cdot N_1 \cdot 6\pi\eta\,(o.75\pi)^{1/3} [\eta]^{1/3} \cdot M^{1/3} \cdot F}{(N_1 \cdot \nu \cdot 1oo)^{1/3} \cdot (1 - \bar{v}\rho)}$$

$$M^{2/3} = \frac{6\pi\,(o.75\pi)^{1/3} F}{(N_1 \cdot \nu \cdot 1oo)^{1/3}} \cdot \frac{s \cdot \rho \cdot [\eta]^{1/3} \cdot N_1}{1 - \bar{v}\rho}$$

Da man die intrinsische Viskosität in dl/g bestimmt, wird der Umrechnungsfaktor in den 1. Term gebracht. Der reziproke Wert des 1. Terms wird als ß tabelliert. Setzt man die Syymmetriefaktoren für eine Kugel ein, (ν = 2.5 und F = 1), ergibt sich der kleinste vorkommende Wert für ß , der $2.12 \cdot 1o^6$ beträgt. ß ist relativ unempfindlich gegenüber Änderungen der Symmetrie, sodaß diese Gleichung meist angewendet wird zur Molgewichtsbestimmung.

3. Ergebnisse

3. 1. Charakterisierung der Troponin-Komplexe

3. 1. 1. Phosphatgehalt der Troponin-Komplexe

Das dephosphorylierte Troponin wurde hergestellt, indem das endogene Phosphat durch alkalische Phosphatase abgespalten wurde. Die Phosphatbestimmung nach 2.2.3. zeigte, daß 5 - 1o% dieses Phosphates nicht entfernt wurde. (vgl. Tab. 1)

Tab. 1

Phosphatgehalt von P^1TI_2C und TI_2C

	Phosphatgehalt verschiedener Troponin-Chargen (mol/9o 2oo g)	
Probe Nr.	vor Hydrolyse	nach Hydrolyse
1	1.15	o.1
2	o.98	o.o5
3	1.o7	o.o5
4	o.95	o.o5

Der Phosphatgehalt des Troponins wurde nach 2.2.3 bestimmt, die Hydrolyse des Phosphats erfolgte nach 2.1.4.

3. 1. 2. Stabilität der Komplexe P^1TI_2C und TI_2C

Nach Dephosphorylierung wurde von beiden Troponin-Komplexen nach 2.2.3. und 2.2.1. die Stabilität bestimmt. Mit den nach (44) bestimmten Färbefaktoren ergab sich für beide Troponin-Komplexe eine Stöchiometrie von 1 : 2 : 1 für T : I : C . (vgl. Abb. 1 und 2)

3. 1. 3. ^{31}P-NMR-Spektren der Troponin-Komplexe P^1TI_2C und TI_2C

Das Phospho-Serin des nativen Troponin-Komplexes zeigt sich als schmales ^{31}P-NMR-Signal und einem Peak bei einem etwas höheren magnetischen Feld, der etwa 2o% des Hauptpeaks ist.

Zugabe von Ca^{2+}, Mg^{2+} oder auch Tropomyosin änderte das Spektrum nicht (13).

Durch Hydrolyse des Phosphates mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm verschwanden beide Phosphat-Signale, das restliche Phosphat konnte im Spektrum nicht nachgewiesen werden. (vgl. Abb. 3)

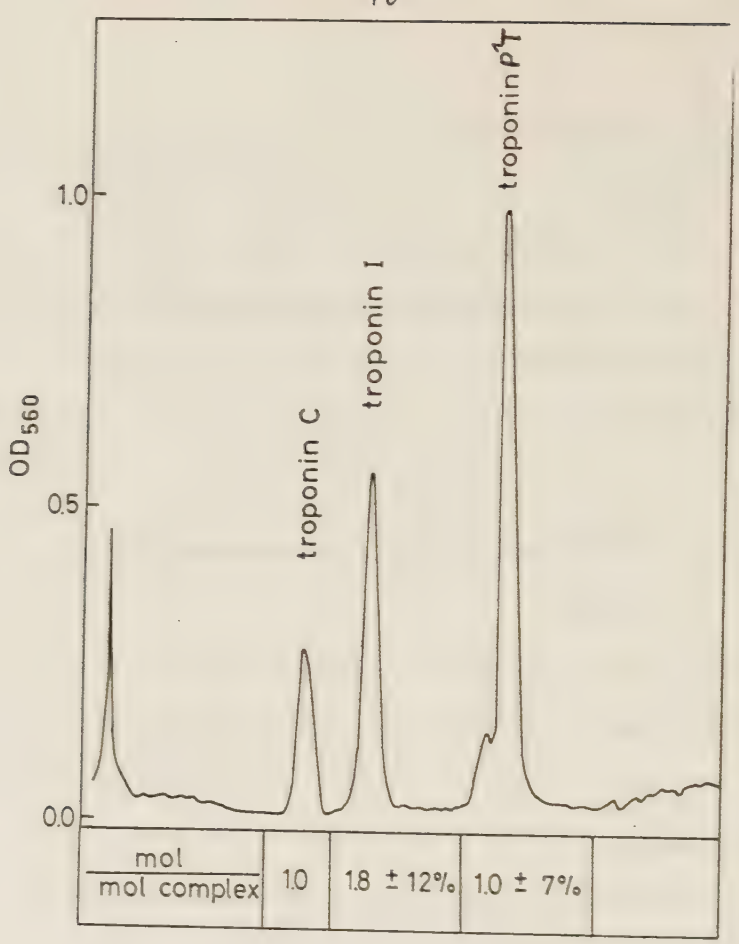


Abb. 1

Gel-Elektrophorese des P^1TI_2C nach Weber und Osborn

P^1TI_2C wurde nach 3-tägiger Inkubation in 0.5 M NH_4Cl/ 10 mM Imidazol/ 10 uM $CaCl_2$/ 3.5 mM $MgCl_2$ pH 7.4 bei 20°C durch SDS-Gelelektrophorese wie in 2.2.1. beschrieben aufgetrennt. Aus den Flächen unter den Peaks wurde das molare Verhältnis der Untereinheiten mit den nach (44) bestimmten Färbefaktoren berechnet.

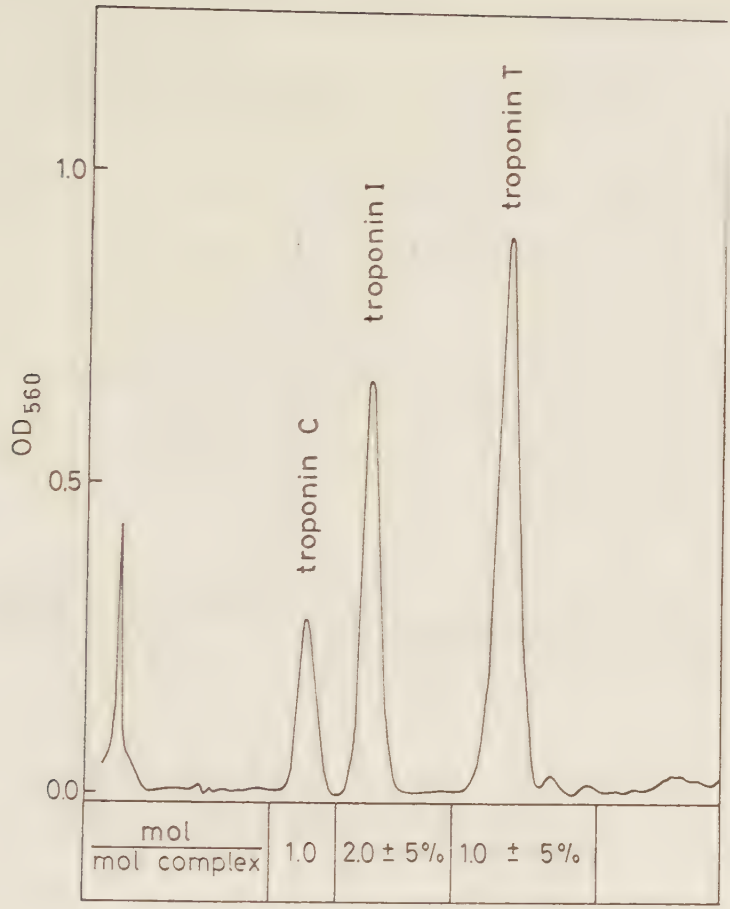


Abb. 2

Gel-Elektrophorese des TI_2C nach Weber und Osborn

TI_2C wurde nach 3-tägiger Inkubation in o.5 M NH_4Cl/ 1o mM Imidazol/ 1o/uM $CaCl_2$/ 3.5 mM $MgCl_2$ pH 7.4 bei 2o°C durch SDS-Gelelektrophorese wie in 2.2.1. beschrieben aufgetrennt. Aus den Flächen unter den Peaks wurde das molare Verhältnis der Untereinheiten mit den nach (44) bestimmten Färbefaktoren berechnet.

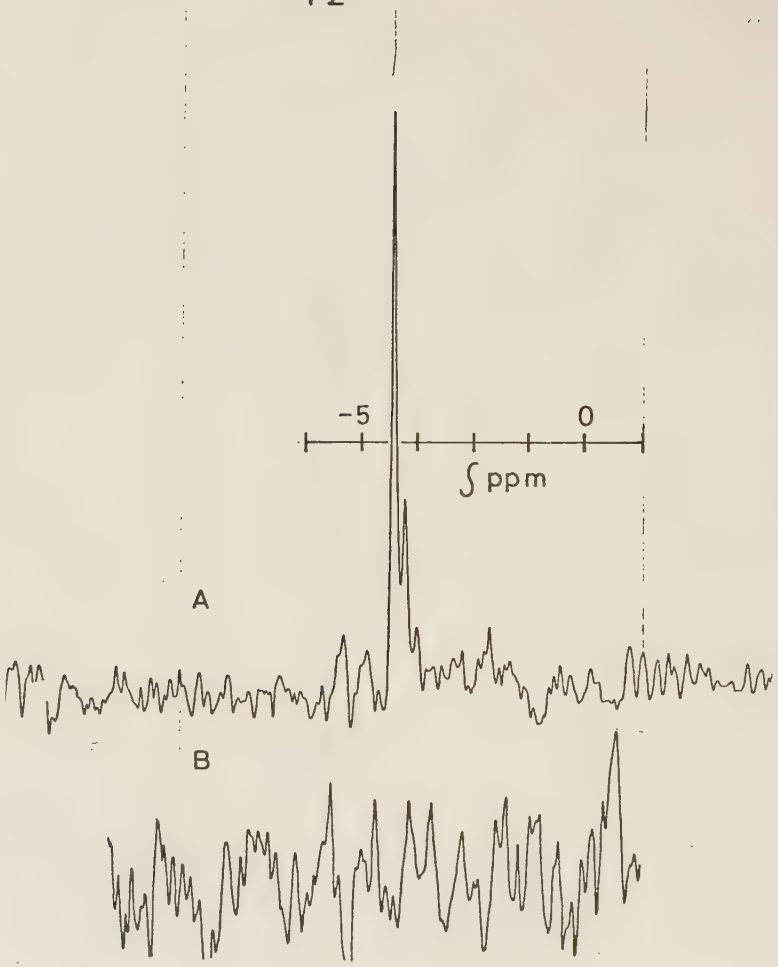


Abb. 3

^{31}P-NMR-Spektren von P^1TI_2C (A) und TI_2C (B)

Die Spektren wurden mit einem Bruker WH 18o bei 72.86 MHz wie in 2.2.5. beschrieben aufgenommen. Spektrum A zeigt P^1TI_2C nach 24 315 Akkumulationen, Spektrum B das TI_2C nach 58 712 Akkumulationen.

3. 2. Grundlagen für die Bindungsmessungen

3. 2. 1. Optimaler Meßbereich der Metallionenkonzentration

Die Messungen erfolgten nach 2. 2. 11.

Zur Auffindung des optimalen Meßbereichs der Metallkonzentration wurden Eichkurven von Ca^{2+} bei einer Wellenlänge von 422.7 nm und von Mg^{2+} bei einer Wellenlänge von 57o.4 nm aufgenommen. Die entsprechenden Titrisole wurden zum einen mit HCL, zum anderen mit einer konzentrierten Stammlösung des Dialysepuffers auf die jeweiligen Konzentrationen verdünnt, um die Pufferkomponenten auf Matrixeffekte zu prüfen. Auch konnten auf diese Weise die Ca^{2+} und Mg^{2+}- Verunreinigungen des Puffers bestimmt werden.

Die verwendeten Pufferkomponenten Imidazol, Ammoniumchlorid und EGTA zeigten keine Matrixeffekte, die Steigung der Eichgeraden war gleich. (Tab. 2 und 4). Die Verunreinigung an Ca^{2+} betrug 5o - 1oo nM, die an Mg^{2+} 1o - 5o nM im verwendeten Wasser, 2oo - 3oo nM im Puffer. (Tab.3 und 5) Bei der Messung von Ca^{2+} trat jedoch ein Alterungseffekt der Graphitrohrküvette auf. Eine neu eingesetzte Küvette zeigte zunächst eine steilere Eichkurve, die nach wenigen Tagen um 15 - 2o% abflachte.

Diese neue Steigung blieb dann konstant bis zum Zerfallen der Küvette.(Tab. 2 und 4). Zugabe von EGTA und hohe Proteinkonzentrationen beschleunigten diesen Prozeß.

Der optimale Meßbereich für Ca^{2+} lag zwischen o.2 und 1o /uM (Tab. 2). Durch mehrmaliges Einspritzen und Eindampfen der Probe bis 9oo°C konnte die Nachweisgrenze auf 5o nM gesenkt werden.

Die Nachweisgrenze lag also im Bereich der Ca^{2+} - Verunreinigung des verwendeten Wassers.

Der optimale Konzentrationsbereich für Mg^{2+}- Bestimmungen lag zwischen o.2 und 1 /uM, aber auch Konzentrationen bis 2 /uM konnten mit hinreichender Genauigkeit bestimmt werden. Die Nachweisgrenze ist auch hier identisch mit der Verunreinigung des destillierten Wassers mit Mg^{2+}. (Tab. 5)

Auffällig ist,daß die Eichkurve nicht, wie im Fall des Ca^{2+}, linear ist, sondern gekrümmt erscheint. Dies erschwert die Auswertung der Mg^{2+}- Konzentrationsmessung, da die Mg^{2+} - Konzentration nicht direkt proportional der Extinktion ist.

Tabelle 2

Abhängigkeit der Steilheit der Ca^{2+}-Eichkurve von der Betriebszeit der Graphitrohrküvette

$[Ca^{2+}]$	E_{423}/20 µl 0 - 200 Messungen	E_{423}/20 µl 200 - 400 Messungen	E_{423}/20 µl 800 - 1000 Messungen	E_{423}/20 µl 3800 - 4000 Messungen
0.5 µM	0.040			
0.5 µM	0.040	0.037	0.025	0.025
1.0 µM	0.073	0.068	0.050	0.048
2.0 µM	0.131	0.125	0.104	0.098
5.0 µM	0.320	0.305	0.250	0.250
10.0 µM	0.643	0.625	0.505	0.495
$\frac{dE_{423}}{d[Ca^{2+}]}$	0.064/µM	0.062/µM	0.050/µM	0.050/µM

Die Extinktion der Ca^{2+}-Eichlösungen in 10 mM Imidazol/0.5 M NH_4Cl wurde wie in 2.2.10. beschrieben gemessen. .
Die anfangs relativ steile Eichkurve verflachte nach Einbrennen der Graphitrohrküvette.

Tabelle 3

Nachweisgrenze Ca^{2+} bei der Atomabsorptionsspektroskopie und Verunreinigung der verwendeten Lösungen

mit Titrisol eingestellte Ca^{2+}-Konzentration	E_{423}/2o/ul Ca^{2+} in H_2O	E_{423}/2o/ul Ca^{2+} in 1o mM Imidazol/o.5 M NH_4Cl
o.o1 /uM	o.oo4	o.oo8
o.o2 /uM	o.oo6	o.oo9
o.o5 /uM	o.oo3	o.oo8
o.1o /uM	o.oo7	o.o1o
o.2o /uM	o.o12	o.o16
o.3o /uM	o.o17	o.o21
o.5o /uM	o.o27	o.o3o
1.oo /uM	o.o52	o.o55
2oo /ul Lösung	o.o25	o.o52
Achsenabschnitt Abszisse	- 5o nM	- 1oo nM
$c_{Ca^{2+}}$	5o nM	1oo nM

Die Ca^{2+}-Konzentration wurde wie in 2.2.1o. beschrieben gemessen.
Einmal wurden die Verunreinigungen in den Lösungen über eine Ca^{2+}-Eichkurve bestimmt, zum anderen durch 1o-maliges Einspritzen der Lösungen. Die Verunreinigung in H_2O betrug 5o nM, die im verwendeten Puffer ca. 1oo nM.

Tabelle 4

Abhängigkeit der Mg^{2+}-Eichkurve von der Betriebsdauer der Graphitrohrküvette

Mg^{2+}	E_{285}/2o/ul o - 5o Messungen	E_{285}/2o/ul 15o - 4oo Messungen	E_{285}/2o/ul 2ooo - 22oo Messungen	E_{285}/2o/ul 28oo - 3ooo Messungen
o.1 /uM	o.152	o.1oo	o.o95	o.1oo
o.2 /uM	o.27o	o.2oo	o.191	o.168
o.5 /uM	o.463	o.318	o.335	o.325
1.o /uM	o.675	o.485	o.515	o.485
1.5 /uM	o.822			
2.o /uM	o.975	o.75o	o.78o	o.785

Die Extinktion der Mg^{2+}-Eichlösungen in 1o mM Imidazol/o.5 M NH_4Cl wurde wie in 2.2.1o. beschrieben gemessen.
Die Einbrennphase zeigt eine steilere Eichkurve (vgl. Tab. 2)

Tabelle 5

Nachweisgrenze von Mg^{2+} bei der Atomabsorptionsspektroskopie und Verunreinigung der verwendeten Lösungen

mit Titrisol eingestellte Mg^{2+}-Konzentration	E_{285}/2o/ul in H_2O bidest.	E_{285}/2o/ul in H_2O millipore	E_{285}/2o/ul in 1o mM Imidazol/ o.5 M NH_4CL
o.oo1 /uM	o.o35	o.oo6	o.2oo
o.oo2 /uM	o.o3o	o.oo8	o.2o5
o.oo5 /uM	o.o33	o.oo8	
o.o1o /uM	o.o34	o.o16	
o.o2o /uM	o.o5o	o.o3o	o.222
o.o5o /uM	o.o78	o.o55	o.25o
o.1o /uM	o.165	o.115	o.275
o.2o /uM	o.225	o.2oo	
Verunreinigung	33 nM	1o nM	ca. 2oo nM

Die Mg^{2+}-Konzentration wurde wie in 2.2.1o. beschrieben gemessen.
Alle anderen Bedingungen sind wie bei Tab. 3.

3. 2. 2. Optimierung des Puffers für die Gelfiltration-Bindungsmessungen

Aus dem unter 2. 2. 11. angeführten Grund wurde als Puffersystem Imidazol/Ammoniumchlorid gewählt.
Da durch die Art der Aufarbeitung die basischen Proteasen vom Troponin abgetrennt wurden,über die Wirkung von sauren Proteasen aber nichts bekannt war,wurde der pH des Puffers ähnlich dem Puffer des Proteolysetestes auf pH 7.4 eingestellt.
Um eine Ionenstärke zu erhalten,die mit dem nativen System möglichst nahekommt,wurde zunächst 2oo mM Ammoniumchlorid zugegeben. Unter diesen Bedingungen jedoch präzipitierten ca. 87% des Troponins auf der Sephadex G 25 - Säule.

Bei Erhöhung der Ammoniumchloridkonzentration auf 3oo mM stieg die Ausbeute auf ca. 52%, erst durch Zugabe von 5oo mM Ammoniumchlorid konnte fast das gesamte Protein wiedergewonnen werden (Tab. 6) .

Tabelle 6

Abhängigkeit der Troponinausbeute bei der Gelfiltration-Bindungsmessung von der Ionenstärke

Ammoniumchlorid-zugabe	14.3. - 21.3.78 Proteinausbeute	3.4. - 1o.4.78 Proteinausbeute	13.4. - 2o.4.78 Proteinausbeute
2oo mM	13 %	1o %	12 %
3oo mM	51 %	48 %	37 %
4oo mM	72 %	69 %	64 %
5oo mM	86 %	89 %	1oo %
7oo mM	96 %	98 %	1oo %

1 - 2 mg Troponin wurden auf eine o.9 x 25 cm große Sephadex G-5o -Säule gegeben und mit 1o mM Imidazolpuffer mit verschiedenen NH_4Cl-Konzentrationen bei pH 7.4 chromatographiert. Nach jedem Lauf wurde das Gel mit 1 M KCl und o.o5 M NaOH regeneriert.

Tabelle 7

Einstellen des Ca^{2+}-Troponin-Gleichgewichts bei der Gelfiltrations-Bindungsmessung

Verweilzeit in der Säule	Bindungsrate in mol/9o 2oo g		
	$P^1TI_2C_{Ca^{2+}_4}$	$P^1TI_2C_{Ca^{2+}_o}$	$TI_2C_{Ca^{2+}_4}$
1o min	4.o5	1.o4	
15 min		1.55	
2o min	3.2o	1.91	o.53
35 min	2.68	2.44	o.63
4o min			o.86
45 min	2.64	2.58	1.12
6o min	2.6o	2.55	2.17
75 min	2.54	2.62	
9o min			2.75
12o min			2.73

Die Gelfiltrations-Bindungsmessungen wurden wie in 2.2.7. beschrieben durchgeführt. Der Ca^{2+}-Spiegel betrug im Fall des P^1TI_2C o.2/uM, im Fall des TI_2C o.5/uM, der Mg^{2+}-Spiegel in allen Versuchsreihen o.2/uM.
$P^1TI_2C_{Ca^{2+}_4}$ ist der mit Ca^{2+} gesättigte für die Messung eingesetzte Troponin-Komplex, $P^1TI_2C_{Ca^{2+}_o}$ der von Ca^{2+} befreite und $TI_2C_{Ca^{2+}_4}$ der mit Ca^{2+} gesättigte dephosphorylierte ^{o}Troponin- Komplex

Tabelle 6

Abhängigkeit der Troponinausbeute bei der Gelfiltration-Bindungsmessung von der Ionenstärke

Ammoniumchlorid-zugabe	14.3. - 21.3.78 Proteinausbeute	3.4. - 1o.4.78 Proteinausbeute	13.4. - 2o.4.78 Proteinausbeute
2oo mM	13 %	1o %	12 %
3oo mM	51 %	48 %	37 %
4oo mM	72 %	69 %	64 %
5oo mM	86 %	89 %	1oo %
7oo mM	96 %	98 %	1oo %

1 - 2 mg Troponin wurden auf eine o.9 x 25 cm große Sephadex G-5o -Säule gegeben und mit 1o mM Imidazolpuffer mit verschiedenen NH_4Cl-Konzentrationen bei pH 7.4 chromatographiert. Nach jedem Lauf wurde das Gel mit 1 M KCl und o.o5 M NaOH regeneriert.

Tabelle 7

Einstellen des Ca^{2+}-Troponin-Gleichgewichts bei der Gelfiltrations-Bindungsmessung

Verweilzeit in der Säule	Bindungsrate in mol/9o 2oo g		
	$P^1TI_2C_{Ca^{2+}_4}$	$P^1TI_2C_{Ca^{2+}_o}$	$TI_2C_{Ca^{2+}_4}$
1o min	4.o5	1.o4	
15 min		1.55	
2o min	3.2o	1.91	o.53
35 min	2.68	2.44	o.63
4o min			o.86
45 min	2.64	2.58	1.12
6o min	2.6o	2.55	2.17
75 min	2.54	2.62	
9o min			2.75
12o min			2.73

Die Gelfiltrations-Bindungsmessungen wurden wie in 2.2.7. beschrieben durchgeführt. Der Ca^{2+}-Spiegel betrug im Fall des P^1TI_2C o.2/uM, im Fall des TI_2C o.5/uM, der Mg^{2+}-Spiegel in allen Versuchsreihen o.2/uM.
$P^1TI_2C_{Ca^{2+}_4}$ ist der mit Ca^{2+} gesättigte für die Messung eingesetzte Troponin-Komplex, $P^1TI_2C_{Ca^{2+}_o}$ der von Ca^{2+} befreite und $TI_2C_{Ca^{2+}_4}$ der mit Ca^{2+} gesättigte dephosphorylierte ^{o}Troponin- Komplex

Tabelle 8

Ca^{2+}-Bindungsraten von Troponin in Abhängigkeit von der Verweilzeit in der Säule

t	Bindungsrate in mol/9o 2oo g im Anwesenheit von Mg^{2+}		
	$P^1TI_2C_{Ca^{2+}_4}$	$TI_2C_{Ca^{2+}_\phi}$	$TI_2C_{Ca^{2+}_4}$
1o min	1.19	o.53	4.o8
2o min	1.18	o.6o	
3o min	1.23	o.87	2.47
45 min	1.2o	1.17	
6o min	1.25	1.22	2.28
75 min	1.18	1.2o	2.o8
9o min			1.81
12o min			1.2o

Die Gelfiltrations-Bindungsmessungen wurden wie in 2.2.7. beschrieben durchgeführt. Die Bedingungen sind wie in Tab. 7 aufgeführt, lediglich die Mg^{2+}-Konzentration wurde auf 1o mM erhöht.

$P^1TI_2C_{Ca^{2+}_4}$ und $TI_2C_{Ca^{2+}_4}$ sind die mit Ca^{2+} gesättigten zur Messung eingesetzten Troponin-Komplexe, $TI_2C_{Ca^{2+}_o}$ der von Ca^{2+} befreite zur Messung eingesetzte Troponin-Komplex.

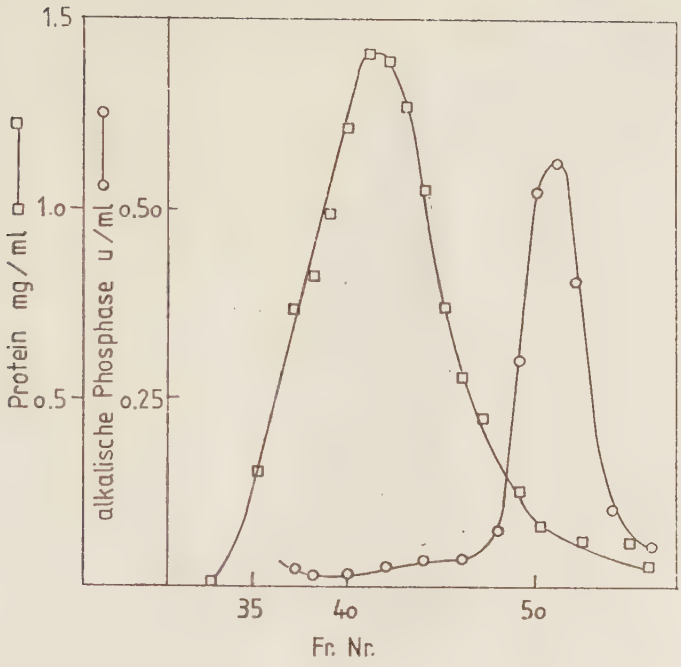


Abb. 4

Abtrennen der alkalischen Phosphatase vom Troponin-Komplex P^1TI_2C wurde wie in 2. 1. 4. beschrieben mit 1% alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert. Anschließend wurde die Phosphatase durch Chromatographie an Sephadex S - 3oo in o.5 M KCl/1mM $NaHCO_3$ pH 7.5 abgetrennt. Die Bestimmung des Proteins in den einzelnen Fraktionen erfolgte nach 2. 2. 2. , die Bestimmung der Phosphataseaktivität durch Inkubation eines Aliquots jeder Fraktion in o.1 M Glycin/1mM $MgCl_2$/1mM $ZnCl_2$/1o mM p-Nitrophenyl-Phosphat pH 1o.5 und photometrischer Verfolgung des Anstiegs der Extinktion bei 4o5 nm.

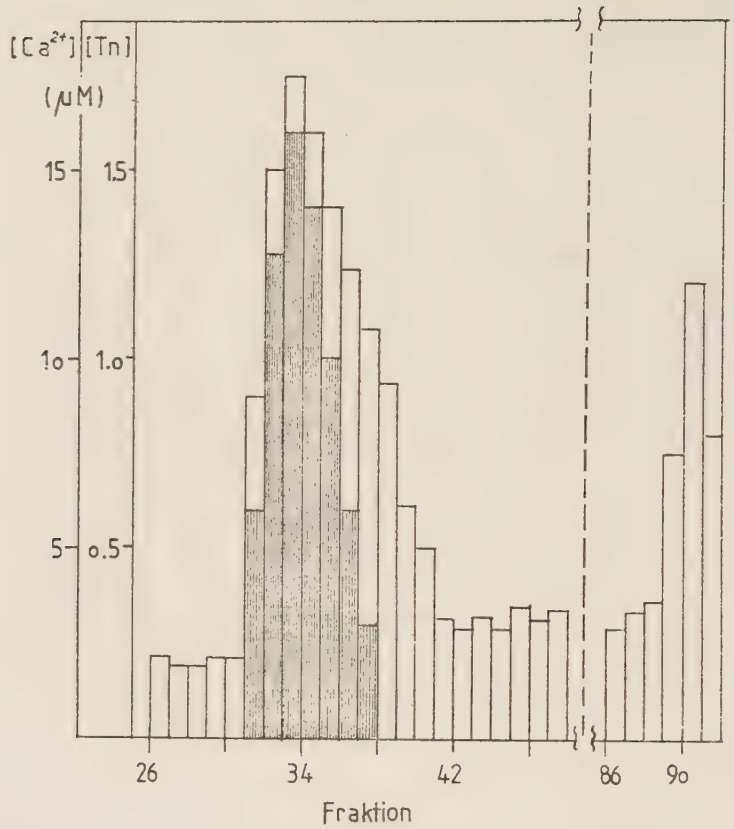


Abb. 5

Chromatographie am Sephadex-G 25 zur Ca^{2+}-Bindungsmessung

Die Ca^{2+}-Bindungsmessungen wurden ausgeführt wie in 2. 2. 7. beschrieben. Diese Abbildung zeigt das Elutionsprofil eines Versuchs, in dem das Troponin noch nicht im Gleichgewicht mit der Pufferkomponente Ca^{2+} war, wie die gegenüber dem Vorlauf höhere Ca^{2+}-Konzentration hinter den Proteinfraktionen zeigt. Der Ca^{2+}-Konzentrationsanstieg ab Fraktion 89 ist bedingt durch das freie Ca^{2+} im Aufgabepuffer.

weiß : Ca^{2+}-Konzentration

schraffiert: Troponin-Konzentration

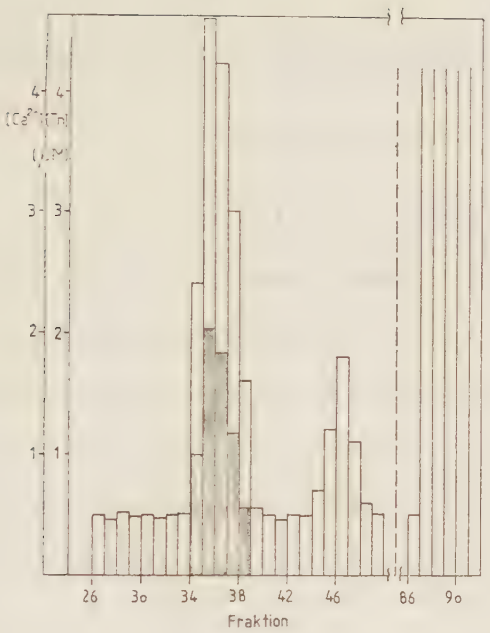


Abb. 6

Chromatographie an Sephadex G-25 zur Ca^{2+}-Bindungsmessung

Die Ca^{2+}-Bindungsmessungen wurden ausgeführt wie in 2.2.7. beschrieben. Nach 3 min wurde der Säulenlauf für 2o min unterbrochen. Der Ca^{2+}-Konzentrationsspiegel vor und nach den Proteinfraktionen ist gleich hoch und zeigt somit an, daß das Troponin mit dem freien Ca^{2+} im Laufpuffer im Gleichgewicht war. Der Ca^{2+}-Konzentrationsanstieg bei Fr. 46 ist bedingt durch die Ca^{2+}-Abgabe des Proteins während der 2o min, in denen der Säulenlauf angehalten wurde, der Ca^{2+}-Konzentrationsanstieg ab Fr. 87 durch das freie Ca^{2+} im Aufgabepuffer.

weiß : Ca^{2+}-Konzentration

schraffiert : Troponin-Konzentration

3.2.4. Einstellen des Ca^{2+}/Mg^{2+} - Troponin-Gleichgewichtes in der Dialysezelle

0.5 ml 1o /uM $CaCl_2$ wurden in die obere Kammer der in 2.2.9. beschriebenen Dialysezelle gegeben und Puffer mit 1 /uM $CaCl_2$ durch die Schnecke gepumpt. Nach jeweils 15 min wurden oben und am Auslauf der Schnecke Proben entnommen und auf Ca^{2+} geprüft. Der Pufferausgleich zwischen oberer und unterer Kammer erfolgte innerhalb 3 h. Da die Ca^{2+} -Auf und Abgabe des Troponins maximal 1.5 h dauert, (3. 2. 1.) wurde nach 5 h Dialyse die erste Troponin-Probe auf ihre Ca^{2+} -Bindung geprüft. Um auszuschließen, daß es sich bei den gemessenen Werten um metastabile Gleichgewichte handelt, wurde nach 24 h jeweils eine weitere Probe entnommen. Die so erhaltenen Bindungskurven des 1-Phospho-Troponins sowie des Dephospho-Troponins zeigten keinen Unterschied zu den nach 2.2.8. ermittelten Graphen.

3. 2. 5. Ca^{2+}/Mg^{2+}- Messungen bei der Druckdialyse

Bei hohen Metallionenkonzentrationen (≥ o.5 mM) wurde die Bindungsrate der Metallionen an die Troponin-Komplexe nach 2.2.1o. bestimmt. Je höher das Protein ankonzentriert wurde, desto geringer wurde die Standardabweichung der Bindungsrate (Tab. 9)

Tab. 9

Mg^{2+}- Bindungsraten bei hoher Proteinkonzentration

Mg^{2+} (mM)	Troponin (uM)	r (mol/mol)	C (%)
o.35	2o	2.9o	6o
o.4o	8o	3.34	26
o.35	15o	3.29	9
o.35	25o	3.33	3

Die Mg^{2+}-Bindungsraten wurden nach 2.2.1o. bestimmt, der Variationskoeffizient C setzt sich aus je 5 Messungen zusammen.

Auf diese Art war es möglich, die Mg^{2+}-Bindungskurve über o.5 - 5 mM zu vermessen.

3.2.6. Verdrängung des Puffers bei hohen Proteinkonzentrationen

Ab 2oo /uM Troponin wurde es nötig, die Metallionenkonzentration in der Probenlösung zu korrigieren, da diese eine geringere Konzentration an Pufferkomponenten aufwies als der Durchfluß (vgl. 2.2.12)

Bei 2oo - 4oo /uM Troponin betrug die nach 2.2.12 bestimmte Differenz 5 - 12 % .

3.2.7. Einfluß von EGTA auf die Metallion-Troponin-Bindungskurven

Die Bestimmung von freiem Ca^{2+} und Mg^{2+} hängt in großem Maße von der Genauigkeit der EGTA-Metallion-Bindungskonstanten ab. Außerdem ist es denkbar, daß das EGTA mit dem Troponin eine Wechselwirkung eingeht und dadurch dessen Eigenschaften beeinflußt. Daher wurde der Teil der Ca^{2+}-Bindungskurve, der unterhalb von 1 /uM Ca^{2+} lag, mit je 5, 1o, 20 und 5o /uM EGTA im Puffer vermessen .

Es war kein Einfluß auf die Ca^{2+}-Bindungsrate festzustellen.

3.3.1. Ca^{2+}-Bindung an P^1 TI_2C und TI_2C bei niederer Mg^{2+}-Konzentration

Bei o.2 µM freiem Mg^{2+} erfolgte die Ca^{2+}-Bindung an beide Komplexe in 2 Stufen.

Die nach 2.3.2. und 2.3.3. bestimmten Bindungsparameter für die beiden Komplexe sind gleich:

beide Stufen entsprechen 2 mol gebundenem Ca^{2+} pro mol Troponin, die $K_{0.5}$-Werte betragen $5.3 \cdot 10^{-9}$ M für die beiden hoch affinen Bindungsseiten und $1.1 \cdot 10^{-6}$ M für die niedrig affinen Bindungsseiten. Die hoch affinen Bindungsseiten zeigen positive Kooperativität mit einem Hill-Koeffizienten von 2.o, während die niedrig affinen keine Wechselwirkung miteinander zeigen (n_H = 1.o8). (Abb. 7 , Tab.1o)

3.3.2. Ca^{2+}-Bindung an P^1 TI_2C und TI_2C bei mittlerer Mg^{2+}-Konzentration

Bei 3.5 mM freier Mg^{2+}-Konzentration sind die 4 bindungsseiten ebenfalls zu beobachten. Während das TI_2C noch 2 diskrete Stufen aufweist, gehen diese im Fall des P^1 TI_2C

ineinander über (Abb. 8), sind aber nach 2.3.2. noch differenzierbar.

Die niedrig affinen Bindungsseiten erscheinen unbeeinflußt, sie zeigen den gleichen $K_{0.5}$ und den gleichen Hill-Koeffizient (Tab.1o).

Das Mg^{2+} beeinflußt hauptsächlich die hoch affinen Ca^{2+}-Bindungsseiten. Hier zeigt sich ein Unterschied zwischen den beiden Troponin-Komplexen:

während der $K_{0.5}$ des $P^1\ TI_2C$ auf das 25-fache anstieg, verdoppelte er sich im Fall des TI_2C lediglich.

Der scheinbare Hill-Koeffizient sank im Fall des TI_2C auf 1.5, im Fall des $P^1\ TI_2C$ auf 1.3 (vgl. Tab.1o).

Generell kann gesagt werden, daß der Einfluß des Mg^{2+} auf die Ca^{2+}- hoch affinen Bindungsseiten beim $P^1\ TI_2C$ größer ist als beim TI_2C.

Eine nach 2.3.3. durchgeführte Bestimmung der Mg^{2+}-Bindungskonstante an diese Seiten ergab im Fall des $P^1\ TI_2C$ $0.6 \cdot 10^{-4}$ M, im Fall des TI_2C $2.8 \cdot 10^{-3}$ M unter Annahme von isosterischer Kompetition an diesen Bindungsseiten.

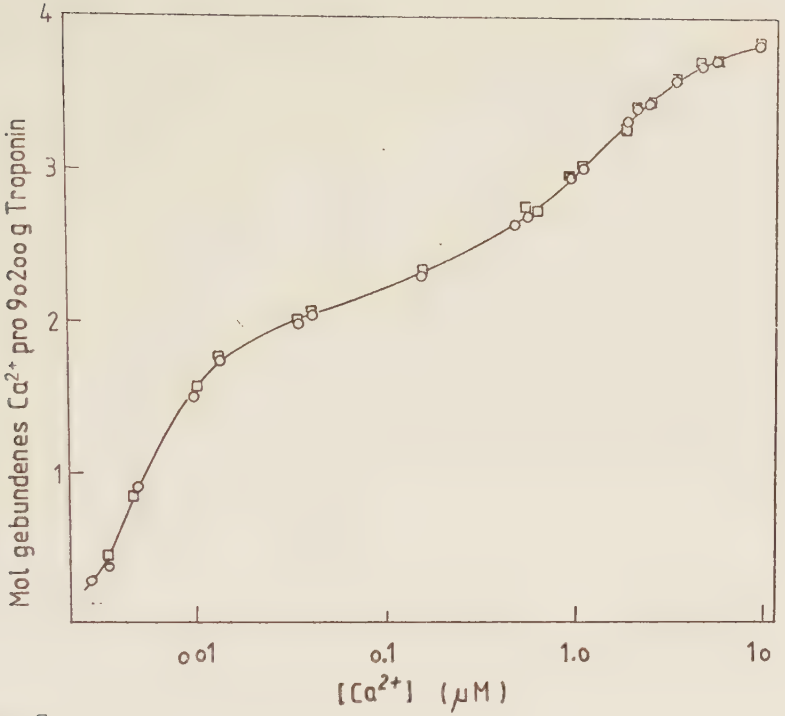


Abb. 7

Ca^{2+}-Bindung an die Troponin-Komplexe bei o.2 µM Mg^{2+}

Die Ca^{2+}-Bindung an die Troponin-Komplexe wurde wie in 2.2.7. - 2.2.12. beschrieben bestimmt. Die Konzentration an kontaminierendem Mg^{2+} betrug bei allen Proben o.2 µM. Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Konzentrationen wurden durch Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt, in EGTA-Puffern wurde die Konzentration an freiem Ca^{2+} und Mg^{2+} nach 2.3.1. bestimmt. Als Molgewicht für Troponin wurde 9o 2oo angenommen (13). Die durchgehende Kurve zeigt den besten Fit der Bindungskurve an die experimentell bestimmten Bindungsraten.

o-o-o P^1TI_2C

□-□-□ TI_2C

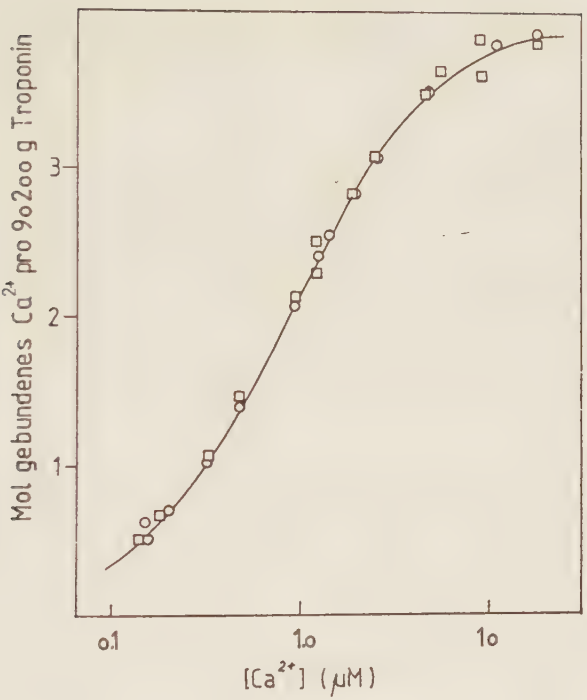


Abb. 9

Ca^{2+}-Bindung an die Troponin-Komplexe bei 1o mM Mg^{2+}

Die freie Mg^{2+}-Konzentration wurde mit $MgCl_2$ auf 1o mM erhöht. Alle anderen Bedingungen sind wie bei Abb. 7 .

o-o-o P^1TI_2C

▫-▫-▫ TI_2C

Tabelle 1o

Ca^{2+}-Bindung von P^1TI_2C und TI_2C

$[Mg^{2+}]$	Parameter	Bindung an den Komplex					
		P^1TI_2C an der Bindungsseite			TI_2C an der Bindungsseite		
		$N_{Ca^{2+}/Mg^{2+}}$	$N_{Ca^{2+}}$	C	$N_{Ca^{2+}/Mg^{2+}}$	$N_{Ca^{2+}}$	C
o.2 /uM	n	2.o	2.o		2.o	2.o	
	$K_{o.5}$	$5.3 \cdot 1o^{-9}M$	$1.1 \cdot 1o^{-6}M$	o.1%	$5.3 \cdot 1o^{-9}M$	$1.1 \cdot 1o^{-6}M$	o.2%
	n_H	2.o	1.1		2.o	1.1	
3.5 mM	n	2.o	2.o		2.o	2.o	
	$K_{o.5}$	$1.3 \cdot 1o^{-7}M$	$1.o \cdot 1o^{-6}M$	3.o%	$1.2 \cdot 1o^{-8}M$	$1.2 \cdot 1o^{-6}M$	1.2%
	n_H	1.3	1.o		1.5	1.o	
1o mM	n	4.o			4.o		
	$K_{o.5}$	$o.9 \cdot 1o^{-6}M$		1.5%	$1.o \cdot 1o^{-6}M$		2.4%
	n_H	1.1			1.1		

Die Anzahl der gebundenen Ca^{2+} (n), die $K_{o.5}$-Werte, die Hill-Koeffizienten (n_h) und die Variationskoeffizienten (C) wurden berechnet wie in 2.3. beschrieben.

3.3.3. Ca^{2+}-Bindung an P^1 TI_2C und TI_2C bei hoher Mg^{2+}-Konzentration

Beide Troponin-Komplexe zeigen bei 1o mM freier Mg^{2+}-Konzentration nur eine Bindungsstufe mit n=4 und $K_{0.5}$= 1.o $1o^{-6}$M. Der gesamte Hill-Koeffizient beträgt 1.o8: die 4 Bindungsseiten binden Ca^{2+} nicht kooperativ. (Tab.1o,Abb. 9)

3.4.1. Mg^{2+}-Bindung an P^1 TI_2C und TI_2C bei niederer Ca^{2+}-Konzentration

In Gegenwart von o.1 nM freiem Ca^{2+} und im Konzentrationsbereich bis 5 mM freiem Mg^{2+} binden beide Troponin-Komplexe 4 mol Mg^{2+} pro mol Protein.(Abb.1o). Oberhalb 5 mM Mg^{2+} konnte die Bindungsrate dieses Metallions an das Troponin nicht bestimmt werden, da die Differenz der Gesamt-Mg^{2+}-Konzentration in der Pufferlösung und in der Troponinlösung in die Größenordnung der Standartabweichung der Mg^{2+}-Bestimmung rückte.

Berechnung nach 2.3.2. löste beide Bindungskurven in 2 Bindungsklassen auf, deren Parameter in Tab. 11 wiedergegeben

sind.

Die Affinität des TI_2C für Mg^{2+} ist geringer als die des P^1 TI_2C.

Die so direkt gemessenen Mg^{2+}-Bindungsparameter zeigen für je eine Bindungsklasse die nach 3.3.2. bestimmten Affinitätskonstanten, so daß es sich hier um die kompetierbaren Bindungsseiten handeln muß. (Abb.10, Tab. 11)

3.4.2. Mg^{2+}-Bindung an P^1 TI_2C und TI_2C bei höherer Ca^{2+}-Konzentration

In Anwesenheit von 50 µM freiem Ca^{2+} werden im Konzentrationsbereich bis 5 mM freiem Mg^{2+} nur 2 mol Mg^{2+} pro mol Troponin gebunden (Abb. 11), die $K_{0.5}$-Werte der beiden Troponinkomplexe zeigen keinen signifikanten Unterschied. (Tab. 11). Die nach 3.3.2. und 3.4.1. bestimmten kompetierbaren Seiten sind, wie zu erwarten, nicht mehr zu sehen. (Abb. 11, Tab. 11)

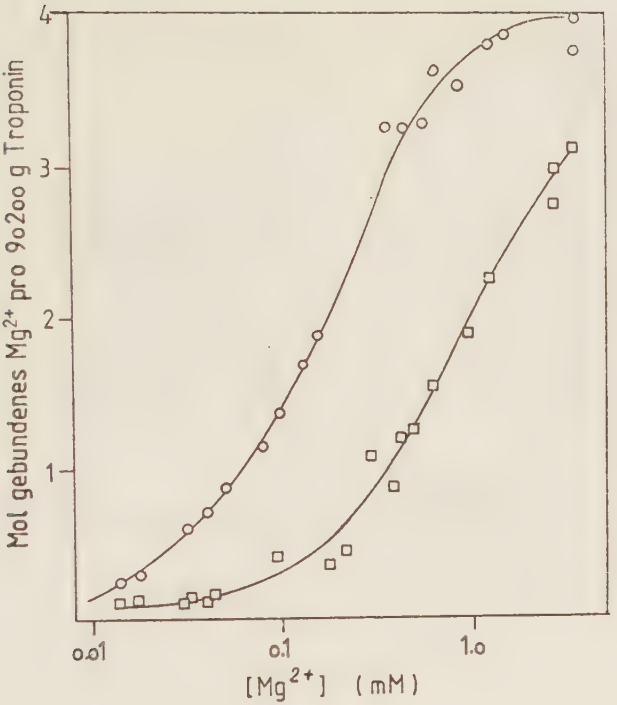


Abb. 1o

Mg^{2+}-Bindung an die Troponin-Komplexe bei o.1 nM Ca^{2+}

Die freie Ca^{2+}-Konzentration wurde durch Zugabe der nach 2.3.1. berechneten Menge EGTA abgesenkt auf o.1 nM .

Alle anderen Bedingungen sind wie bei Abb. 7 .

o-o-o TI_2C

□-□-□ TI_2C

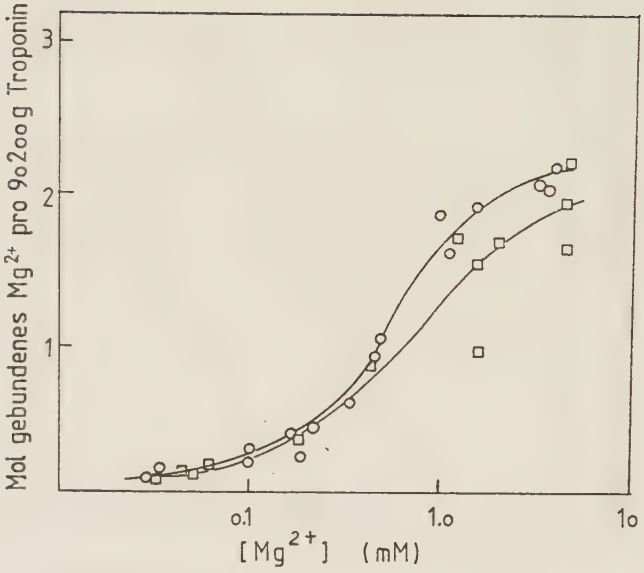


Abb. 11

Mg^{2+}-Bindung an die Troponin-Komplexe bei 5o/uM Ca^{2+}

Die freie Ca^{2+}-Konzentration wurde durch Zugabe von $CaCl_2$ auf 5o/uM erhöht. Alle anderen Bedingungen sind wie bei Abb. 7 .

o-o-o P^1TI_2C

▫-▫-▫ TI_2C

Tabelle 11

Mg^{2+}-Bindung von P^1TI_2C und TI_2C

$[Ca^{2+}]$	Parameter	Bindung an den Komplex					
		P^1TI_2C an der Bindungsseite			TI_2C an der Bindungsseite		
		$N_{Ca^{2+}/Mg^{2+}}$	$N_{Mg^{2+}}$	C	$N_{Ca^{2+}/Mg^{2+}}$	$N_{Mg^{2+}}$	C
o!1 nM	n	2.o	2.o		2.o	2.o	
	$K_{o.5}$	$6.7 \cdot 1o^{-5}M$	$4.8 \cdot 1o^{-4}M$	o.9%	$2.o \cdot 1o^{-3}M$	$6.3 \cdot 1o^{-4}M$	3.o%
	n_H	1.8	1.5		1.o	1.o	
5o /uM	n	-	2.o		-	2.o	
	$K_{o.5}$	-	$4.8 \cdot 1o^{-4}M$	2.4%	-	$6.3 \cdot 1o^{-4}M$	4.4%
	n_H	-	1.5		-	1.o	

Die Anzahl der gebundenen mol Mg^{2+}/9o 2oo g Troponin (n), die $K_{o.5}$-Werte, der Hillkoeffizient (n_H) und der Variationskoeffizient (C) wurde wie in 2.3. beschrieben berechnet.

3. 5. Viskosimetrie

3. 5. 1. Viskosität der Troponin-Komplexe und des Tropomyosins

Um den Einfluß der Pufferkomponenten und der Durchflußzeit durch die Kapillare auf die Viskosität der einzelnen Proteine zu testen, wurde folgende Versuchsanordnung gewählt:

Aliquots von P^1TI_2C, TI_2C und Tropomyosin wurden nach Reduktion mit ME gegen

1. o5. M NH_4Cl/1o mM Imidazol pH 7.4
2. o.5 M NH_4Cl/1o mM Imidazol/1o /uM Ca^{2+} pH 7.4
3. o.5 M NH_4Cl/1o mM Imidazol/3.5 mM Mg^{2+} pH 7.4
4. o.5 M NH_4Cl/1o mM Imidazol/ 1 mM EGTA pH 7.4

dialysiert.

Eine Verdünnungsreihe der jeweiligen Proteine in den Puffern 1. - 4. zwischen o.5 /uM und 2o /uM wurde in zwei verschiedenen Viskosimetern für die Messungen eingesetzt. Die Durchlaufzeiten der Viskosimeter betrugen für 1 ml ca. 35 sec und 1oo sec.

die gemessene Viskosität der Proben war unabhängig von

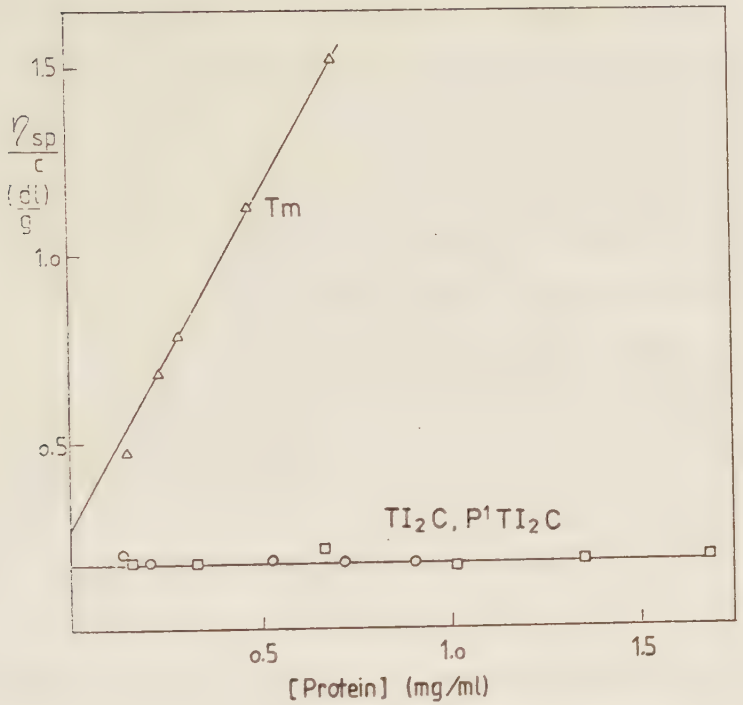


Abb. 12

Reduzierte Viskositäten von Tropomyosin und den Troponin-Komplexen in 1o mM Imidazol/o.5 M NH_4Cl pH 7.4

Die Messungen wurden wie in 2.2.13. beschrieben durchgeführt. Die reduzierte Viskosität aller Proteine war unabhängig von der Zugabe von $CaCl_2$, $MgCl_2$ oder EGTA in den verwendeten Mengen.

o-o-o P^1TI_2C

□-□-□ TI_2C

Δ-Δ-Δ Tropomyosin

der Wahl des Viskosimeters, d.h. Scherkräfte traten bei keinem Protein in Erscheinung.

Die spezifische Viskosität der einzelnen Proteine war unabhängig von den Pufferzusätzen Ca^{2+}, Mg^{2+} und EGTA, d.h. die Pufferkomponenten zeigten keinen Einfluß auf das Volumen der hydratisierten Proteine.

Die Abhängigkeit der reduzierten Viskosität von der Proteinkonzentration zeigt Abb. 12, die intrinsischen Viskositäten sind in Tab. 12 wiedergegeben.

Tab. 12

Protein	(dl/g)	C	a (M^{-1})	b (M^{-2})
P^1TI_2C	o.183	9%	1 64o	-
TI_2C	o.182	4%	1 63o	-
Tropomyosin	o.28o		1 83o	4.92 $1o^9$

Die intrinsische Viskosität der Proteine wurde aus der Ausgleichsgerade der Abb. 12 bestimmt ebenso wie die nach Gl.18 bestimmten Konstanten a und b.

Die Viskosität der beiden Troponin-Komplexen gehorcht der Beziehung $\eta_{sp}=(a/M)\ c_o$, d.h. es existiert keine Wechselwirkung zwischen den einzelnen Molekülen. Im Gegen-

satz dazu neigt das Tropomyosin mit steigender Konzentration zur Aggregation, der Verlauf der spezifischen Viskosität wird durch die Gleichung $\eta_{sp}=(a/M)\cdot c_o+(b/M^2)\cdot c_o^2$ wiedergegeben. (vgl. Gl. 18)

3. 5. 2. Titration von Tropomyosin mit P^1TI_2C und TI_2C

Zur Titration wurden Proben von 2.2 µM und 3.4 µM Tropomyosin in o.5 M NH_4Cl/1o mM Imidazol pH 7.4 eingesetzt. Nach Zugabe von Aliquots von P^1TI_2C und TI_2C wurde die Viskosität nach 2. 2. 13. bestimmt.

Die Titrationskurven sind in Abb. 13 wiedergegeben.

Man beobachtet eine steile Phase des Viskositätsanstiegs auf Troponinzugabe, der von einer flachen Phase gefolgt wird. Unter der Annahme, daß die steile Phase die Komplexbildung wiederspiegelt und die flache Phase den Viskositätsanstieg infolge überschüssigen Troponins, liegt der Äquivalenzpunkt im Schnittpunkt der beiden Geraden bei 2.2 µM bzw. 3.4 µM Troponin-Zugabe, was für beide Troponin-Komplexe einer Stöchiometrie von 1 : 1 entsprechen würde.

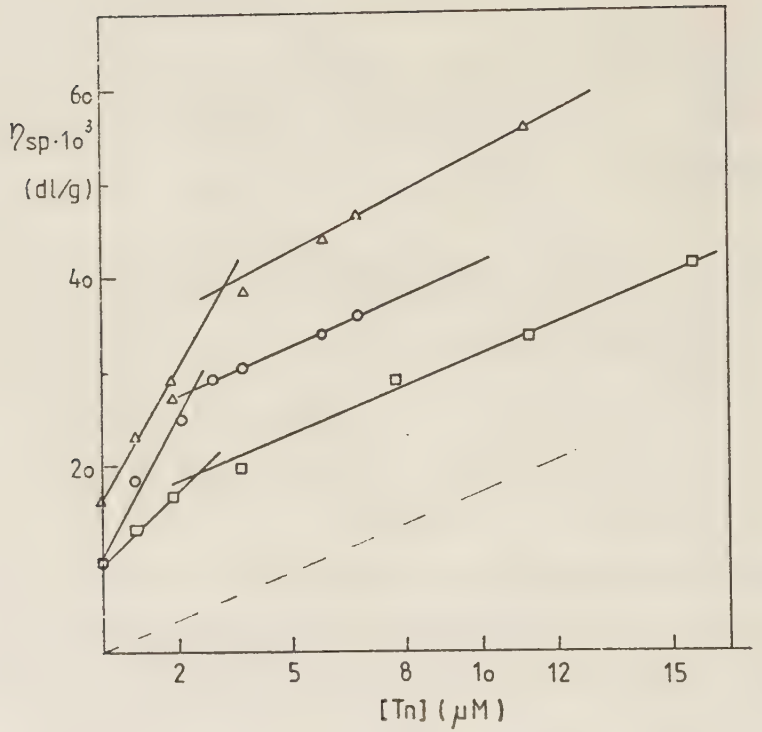


Abb. 13

Titration von Tropomyosin mit Troponin

Aliquots von Tropomyosin wurden mit steigenden Konzentrationen von P^1TI_2C und TI_2C versetzt und deren Viskosität nach 2.2.13. und 2.3.4. bestimmt.

▯-▯-▯ P^1TI_2C-Zugabe auf 2.35 /uM Tropomyosin

Δ-Δ-Δ P^1TI_2C-Zugabe auf 3.4o /uM Tropomyosin

o-o-o TI_2C-Zugabe auf 2.35 /uM Tropomyosin

----- Troponin allein

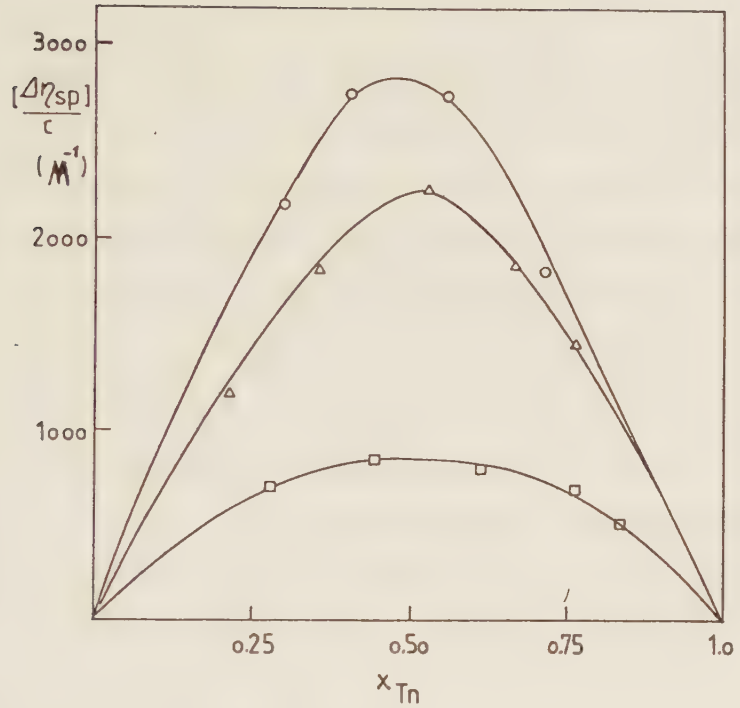


Abb. 14

Titration von Tropomyosin mit Troponin

Die Bedingungen sind dieselben wie bei Abb. 13 .

Die Differenz der reduzierten Viskositäten zwischen den berechneten Werten im Fall, daß keine Wechselwirkung zwischen den Proteinen vorliegt, und den gemessenen Werten ist gegen den Molenbruch an Troponin aufgetragen.

Δ-Δ-Δ 3.40 /uM Tropomyosin, Titration mit P^1TI_2C

□-□-□ 2.35 /uM Tropomyosin, Titration mit P^1TI_2C

o-o-o 2.35 /uM Tropomyosin, Titration mit TI_2C

Rechnet man nach Gl. 17 zurück auf η_{sp1+2} unter der Annahme, daß keine weitere Wechelwirkung auftritt, und vergleicht diese Werte mit den gemessenen η_{sp1+2}/c, ergibt sich bei der Auftragung der Differenzen der η_{sp1+2}/c gegen den Molenbruch an Troponin Abb. 14. Die größte Differenz tritt bei einem Molenbruch von 5o % Troponin auf. Diese Abbildung zeigt deutlicher als Abb. 13, daß es sich bei dem Troponin-Tropomyosin um einen äquimolaren Komplex handelt.

Die Komplexbildung ist im Fall des TI_2C stärker ausgeprägt als die des P^1TI_2C.

3. 5. 3. Viskosität eines 1 : 1-Gemisches von Troponin und Tropomyosin in Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration

Von einer Stammlösung (3.2 mg/ml) eines Troponin-Tropomyosingemisches 9g:7g (= molares Verhältnis 1 : 1) in o.5 M NH_4Cl/1o mM Imidazol pH 7.4 wurden Verdünnungs-

reihen zwischen o.o5 und 1.6 mg/ml hergestellt.
Die entgültigen Ca^{2+}-Konzentrationen lagen bei o.1 nM, 15 nM und 1o /uM.
Abb. 15 und 16 zeigen den Verlauf der reduzierten Viskosität η_{sp}/c der Gemische bei verschiedenen freien Ca^{2+}-Konzentrationen. Die intrinsischen Viskositäten betragen unabhängig von der freien Ca^{2+}-Konzentration o.25 dl/g für beide Tropomyosin-Troponin-Komplexe.
Bei 15 nM und 1o /uM freiem Ca^{2+} zeigt sich ein 1-phasiger Verlauf der Kurve. Zur Beschreibung der spezifischen Viskosität reicht die Gleichung 2. Ordnung nicht mehr aus, d. h. es treten mehr als zwei Moleküle in Wechelwirkung. Die Kurve des Komplexes TI_2C-Tropomyosin liegt deutlich über der des Komplexes P^1TI_2C-Tropomyosin und zeigt wiederum, daß die Komplexbildung des TI_2C stärker ausgeprägt ist.
Erniedrigt man die freie Ca^{2+}-Konzentration auf o.1 nM, zeigen beide Komplexe 2-phasiges Verhalten. Die 1. Phase zeigt einen asymptotischen Anstieg auf o.43 dl/g. Ab o.4 mg/ml sieht man die 2. Phase, die Ähnlichkeit mit

dem bei 15 nM und 1o/uM Ca^{2+} beschriebenen Viskositätsverlauf aufweist. Die Kurven entsprechen einer Ca^{2+}-Besetzung des Troponins von o (o.1 nM), 2 (15nM) und 4 (1o/uM) mol/ 9o 2oo g.

Wiederholt man die Versuche in Anwesenheit von 3.5 mM Mg^{2+}, ergeben sich die in Abb. 17 - 2o dargestellten Viskositätsverläufe. In Abwesenheit von Ca^{2+} steigt die Viskosität des Tn-Tm-komplexes bis auf o.45dl/g an. Dieser Grenzwert wird beibehalten bis ca.1.2 mg/ml, danach steigt die Viskosität linear an (Abb. 17).

Sättigung der hoch affinen Ca^{2+}-Bindungsstellen mit Ca^{2+} verschiebt die lineare Phase der Viskosität zu niedrigeren Proteinkonzentrationen (Abb. 18), Sättigung der niedrig affinen Ca^{2+}-Bindungsstellen läßt die im vorigen Abschnitt beschriebene Phase verschwinden, so daß nur noch die Phase des linearen Viskositätsanstieges zu sehen ist (Abb. 19 und 2o) .

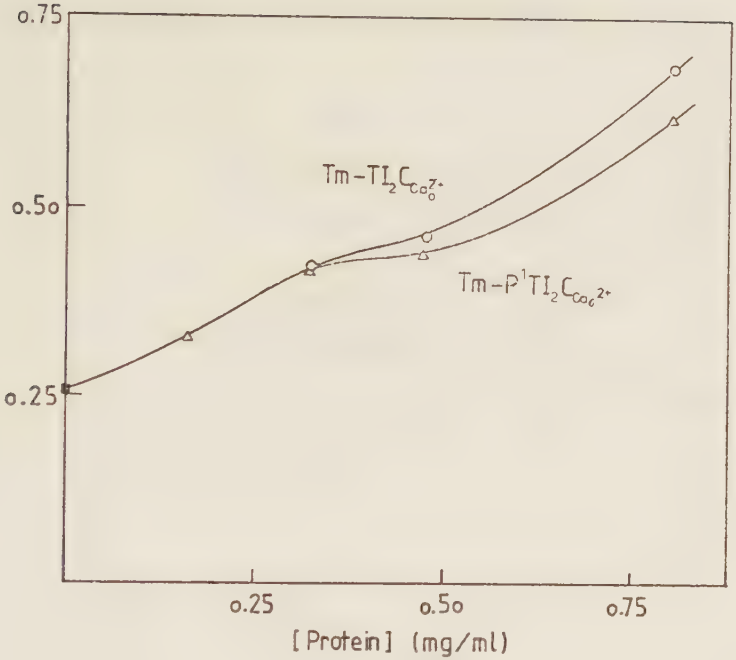


Abb. 15

Viskosität eines 1 : 1 -Gemisches von Troponin und Tropomyosin bei o.2 /uM Mg^{2+} und o.1 nM Ca^{2+}

Eine Stammlösung von o.9 mg/ml Troponin und o.7 mg/ml Tropomyosin in o.5 M NH_4Cl/1o mM Imidazol/EGTA pH 7.4 wurde verdünnt und nach 2.2.13. und 2.3.4. zur Viskosimetrie eingesetzt. ■ = berechnete intrinsische Viskosität der Summenkurve

Δ-Δ-Δ Tm-$P^1TI_2C_{Ca}{}^{2+}_{o}$

o-o-o Tm-$TI_2C_{Ca}{}^{2+}_{o}$

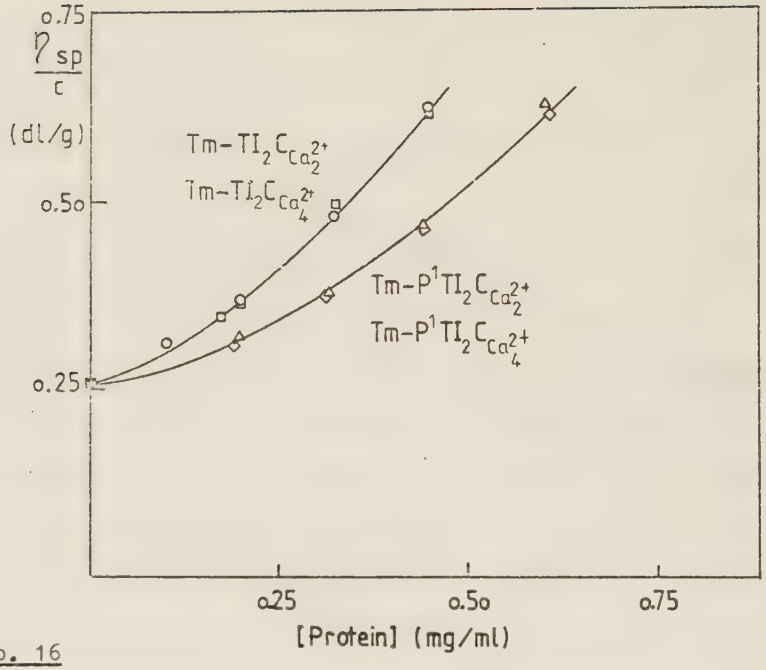


Abb. 16

Viskosität eines 1 : 1 -Gemisches von Troponin und Tropomyosin bei o.2 /uM Mg^{2+} und 15 nm sowie 1o /uM Ca^{2+}

Eine Stammlösung von o.9 mg/ml Troponin und o.7 mg/ml Tropomyosin in o.5 M NH_4Cl/1o mM Imidazol und entsprechende Mengen Ca^{2+} pH 7.4 wurden wie in Abb. 15 beschrieben zur Viskosimetrie eingesetzt.

◭-◭-◭ $Tm\text{-}P^1TI_2C_{Ca_{2HA}}^{2+}$

◇-◇-◇ $Tm\text{-}P^1TI_2C_{Ca_4}^{2+}$

□-□-□ $Tm\text{-}TI_2C_{Ca_{2HA}}^{2+}$

o-o-o $Tm\text{-}TI_2C_{Ca_4}^{2+}$

■ berechnete intrinsische Viskosität der Summenkurve

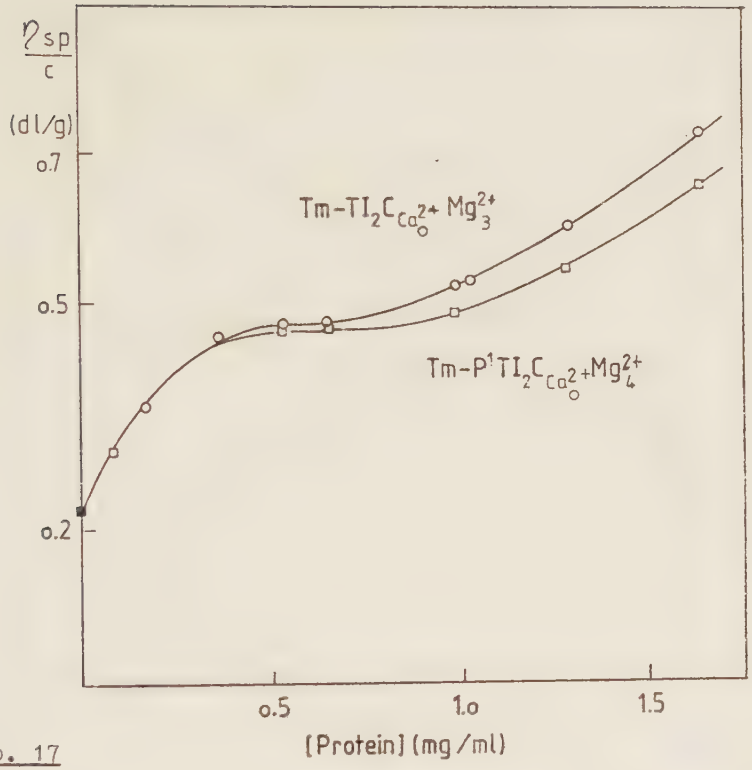


Abb. 17

Viskosität eines 1 : 1 -Gemisches von Troponin und Tropomyosin bei 3.5 mM Mg^{2+} und o.1 nM Ca^{2+}

Eine Stammlösung von 1.8 mg/ml Troponin und 1.4 mg/ml Tropomyosin in o.5 M NH_4Cl/1o mM Imodazol/entsprechenden Mengen $CaCl_2$ und EGTA/3.5 mM $MgCl_2$ pH 7.4 wurde verdünnt und nach 2.2.13. und 2.3.5. zur Viskosimetrie eingesetzt. ■ = intrinsische Viskosität der Summenkurve

□-□-□ Tm-$P^1TI_2C_{Mg^{2+}_4}$

o-o-o Tm-$TI_2C_{Mg^{2+}_3}$

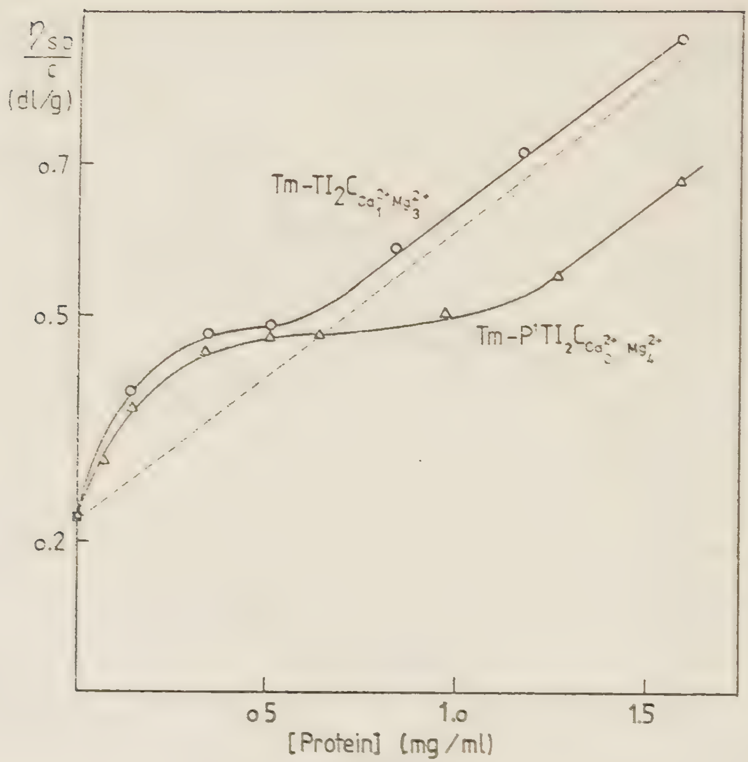


Abb. 18

Viskosität eines 1 : 1 -Gemisches von Troponin und Tropomyosin bei 3.5 mM Mg^{2+} und 15 nM Ca^{2+}

Die Bedingungen sind die gleichen wie bei Abb. 17.

Δ-Δ-Δ $Tm\text{-}P^1TI_2C\,Ca^{2+}_2Mg^{2+}_4$

o-o-o $Tm\text{-}TI_2C\,Ca^{2+}_1Mg^{2+}_3$

■ berechnete intrinsische Viskosität der Summenkurve

---- Summenkurve nach 2.3.4.

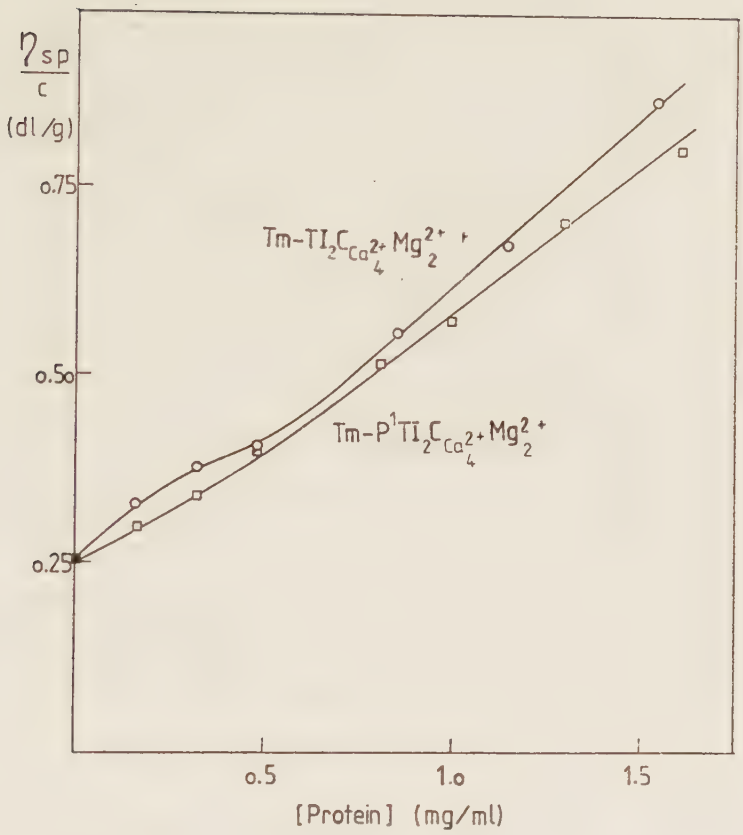


Abb. 2o

Viskosität eines 1 : 1 -Gemisches von Troponin und Tropomyosin bei 3.5 mM Mg^{2+} und 1o /uM Ca^{2+}

Die Bedingungen sind die gleichen wie in Abb. 17.

▫-▫-▫ Tm-P^{1}TI$_2$C$_{Ca_4^{2+}}$Mg$_{2NA}^{2+}$

o-o-o Tm- TI$_2$C$_{Ca_4^{2+}}$Mg$_{2NA}^{2+}$

▪ berechnete intrinsische Viskosität der Summenkurve

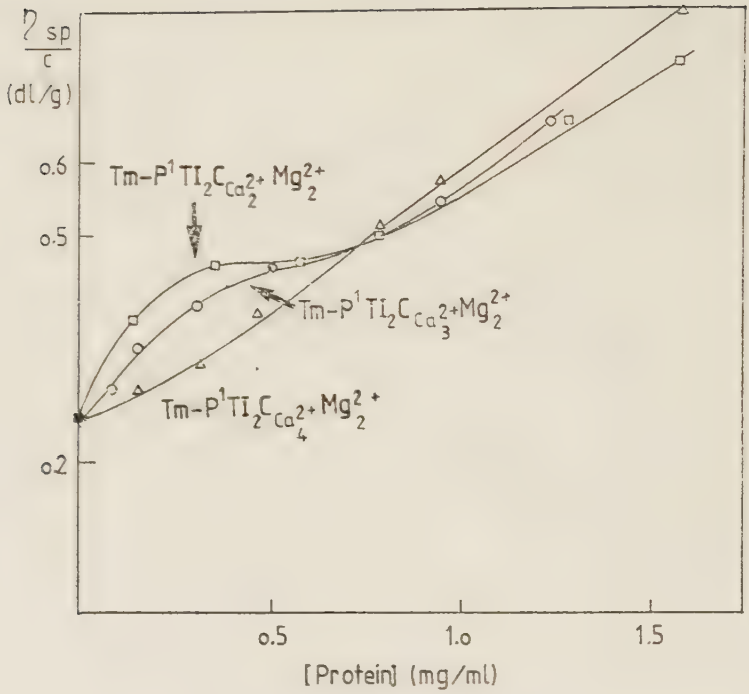


Abb. 19

Viskosität eines 1 : 1 -Gemisches von P^1TI_2C und Tropomyosin bei 3.5 mM Mg^{2+} und o.3, 1.3 und 1o /uM Ca^{2+}

Die Bedingungen sind die gleichen wie in Abb. 17.

▲-▲-▲ Tm-$Tn_{Mg^{2+}_2Ca^{2+}_2}$

o-o-o Tm-$Tn_{Mg^{2+}_2Ca^{2+}_3}$

Δ-Δ-Δ Tm-$Tn_{Mg^{2+}_2Ca^{2+}_4}$

■ berechnete intrinsische Viskosität der Summenkurve

3. 6. Sedimentationskonstanten von P^1TI_2C, TI_2C, Tropomyosin sowie die der möglichen Komplexe

Die Sedimentationskonstanten der Proteine P^1TI_2C, TI_2C, Tropomyosin sowie eines 1 : 1-Gemisches von Tropomyosin und Troponin wurden nach 2. 2. 5. bestimmt.

Die Abhängigkeit der Position der Proteinfront von der Zeit zeigen Abb. 21 bis 26.

Im eingesetzten Konzentrationsbereich von o.3 mg/ml bis 1.6 mg/ml zeigt sowohl Troponin P^1TI_2C als auch Troponin TI_2C keine Abhängigkeit des S-Wertes von der Konzentration. Beide Troponinkomplexe sedimentieren bei 4^oC einheitlich mit 2.7 S.

Unterließ man vor dem Lauf die Behandlung mit ME, stieg der S-Wert mit zunehmenden Alter der Troponin-Charge sowohl beim P^1TI_2C als auchbeim TI_2C auf über 3.7 an.

Der S-Wert des eingesetzten Tropomyosins war ebenfalls unabhängig von der Proteinkonzentration, aber auch von der Behandlung mit ME. Er lag unter den Bedingungen von 2. 2. 15. bei 2. o. . Dies ist erstaunlich, da die Viskosimetrie ergeben hatte, daß das Tropomyosin in Abhängigkeit

von der Konzentration Aggregate bildet.

Setzte man ein 1 : 1 -Gemisch von Troponin und Tropomyosin ein, zeigten sich bei 3.5 mM Mg^{2+} und 4o /uM Ca^{2+} nach ca. 1 Stunde Sedimentation 2 Stufen, deren Wanderungsgeschwindigkeit in Abb. 23 und 25 dargestellt ist. Die untere Front sedimentierte mit einem S-Wert von 2.o, war somit identisch mit freiem Tropomyosin, die obere wies im Fall des P^1TI_2C einen S-Wert von 3.7 auf, im Fall des TI_2C einen S-Wert von 3.4. Diese S-Werte repräsentieren den Komplex Troponin-Tropomyosin. Die Stufe des freien Troponins war nicht faßbar. Entzog man dem Puffer Ca^{2+} durch EGTA-Zugabe, trat eine weitere Stufe mit einem S-Wert von 2.7 bei beiden Troponin-Komplexen in Erscheinung.

Eine Übersicht über die S-Werte sowie über die zugehörigen $S_{2o,w}$-Werte gibt Tab. 13 an.

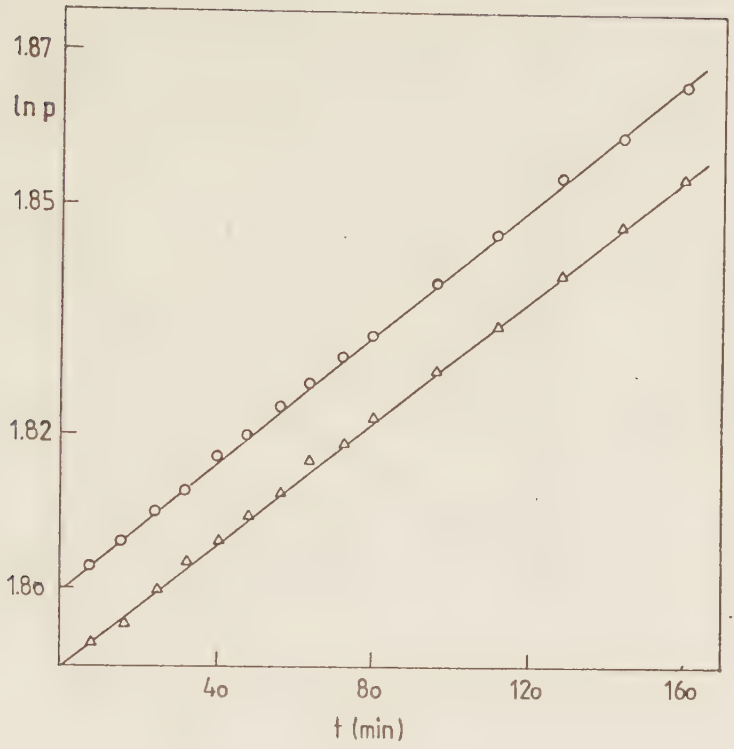


Abb. 21

Sedimentationslauf mit 0.45 mg/ml Troponin in 10 mM Imidazol/0.5 M Ammoniumchlorid pH 7.4

ω = 47 920 Upm T = 4° C

Δ-Δ-Δ TI_2C S_{40} = 2.70

o-o-o P^1TI_2C S_{40} = 2.72

p = Abstand der Proteinfront vom Rotationsmittelpunkt in cm

Die Versuche wurden wie in 2.2.14. und 2.3.5. beschrieben durchgeführt.

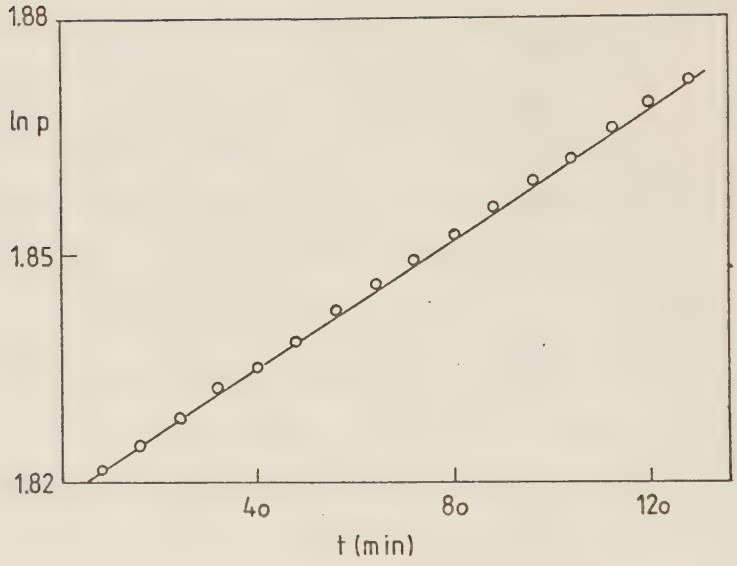


Abb. 22

Sedimentationslauf mit 0.35 mg/ml Tropomyosin in 10 mM Imidazol/0.5 M Ammoniumchlorid pH 7.4

ω = 55 940 Upm $\quad$ T = 4° C

S_{40} = 1.99

p = Abstand der Proteinfromt vom Rotationsmittelpunkt in cm

Die Versuche wurden wie in 2.2.14. und 2.3.5. beschrieben durchgeführt.

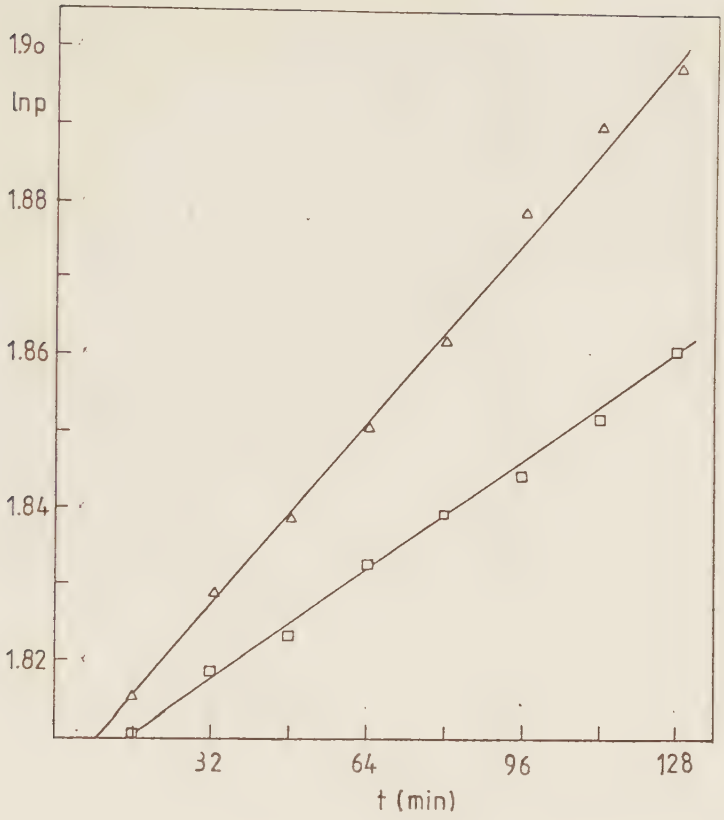


Abb. 23

Sedimentationslauf mit Tm-P^{1}TI$_2$C$_{Ca_4^{2+}Mg_{2NA}^{2+}}$ 50 uM Ca^{2+}/3.5 mM Mg^{2+}

ω = 55 880 Upm T = 4°C

□-□-□ E = 0.0 - 0.10 S_{40} = 2.13

Δ-Δ-Δ E = 0.10 - 0.16 S_{40} = 3.70

Alle anderen Bedingungen sind bei Abb. 21 beschrieben.

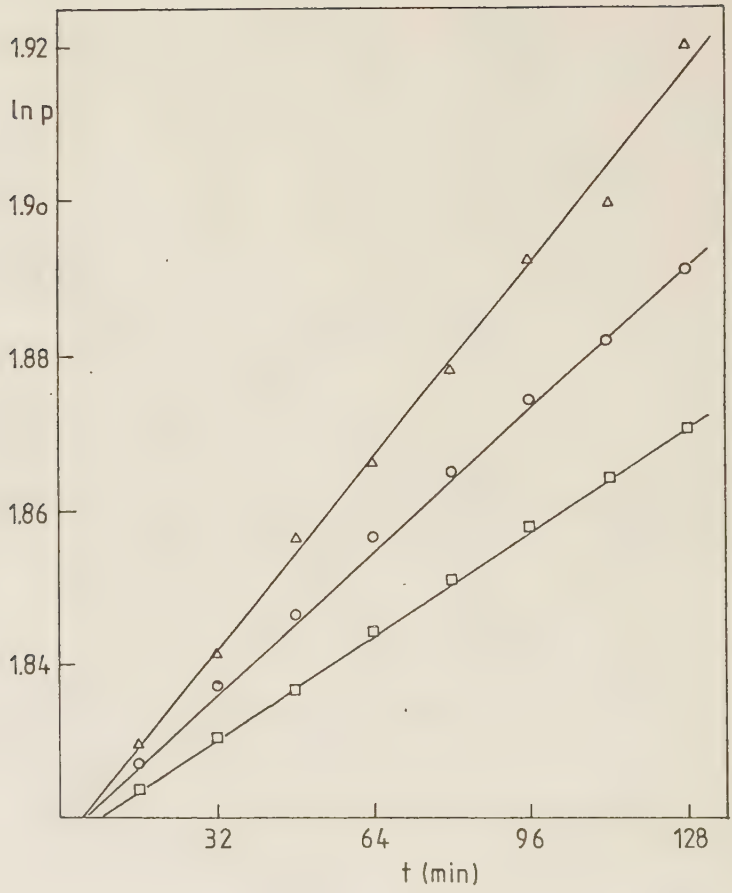


Abb. 24

Sedimentationslauf mit $T_{m-P^1}TI_2C_{Mg_4^{2+}}$ 5o µM EGTA/3.5 mM Mg^{2+}

ω = 55 85o Upm T = 4° C

□-□-□ E = o.o - o.1o S = 2.o2

o-o-o E = o.1o - o.14 S = 2.78

Δ-Δ-Δ E = o.14 - o.18 S = 3.92

Alle anderen Bedingungen sind wie in Abb.21 beschreiben.

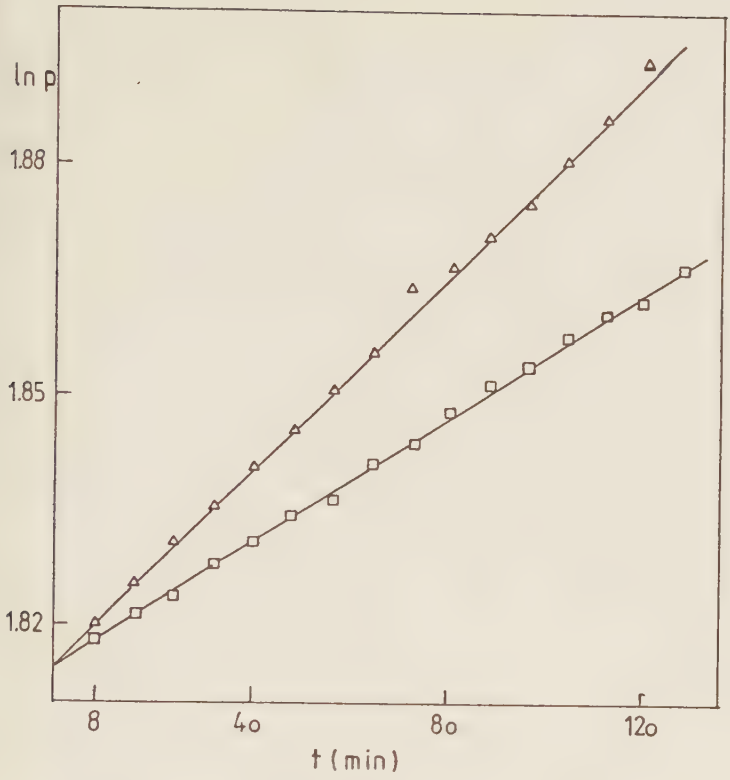


Abb. 25

Sedimentationslauf mit Tm-$TI_2{}^{C}Ca^{2+}{}_{4}Mg^{2+}_{2NA}$ 5o µM Ca^{2+}/3.5 mM Mg^{2+}

ω = 55 96o Upm T = 4° C

□-□-□ E = o.o - o.12 S = 1.98

Δ-Δ-Δ E = o.12- o.18 S = 3.19

Alle anderen Bedingungen sind wie bei Abb. 21 beschrieben.

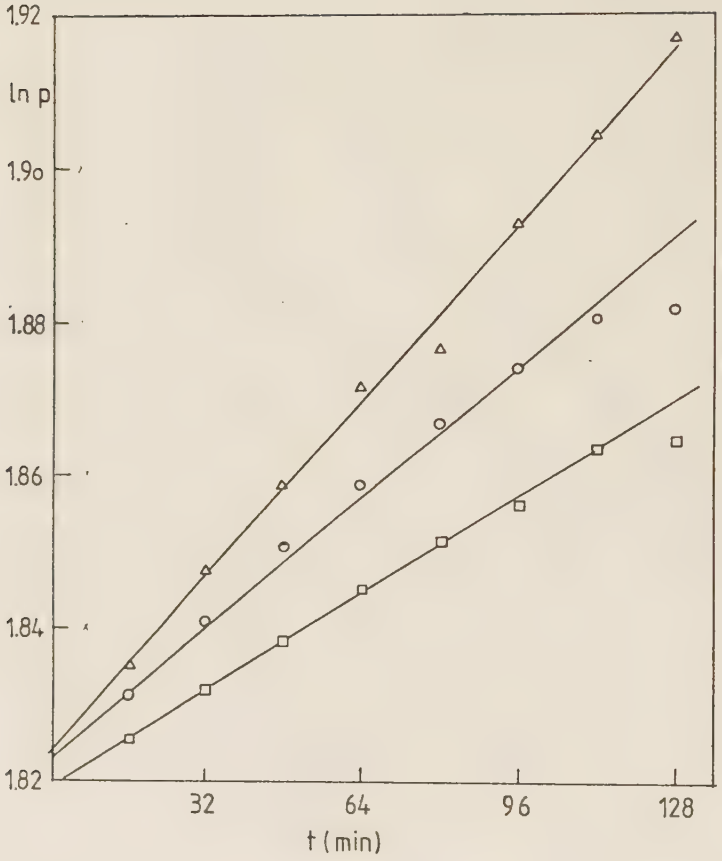


Abb. 26

Sedimentationslauf mit $Tm\text{-}TI_2C_{Mg}^{2+}{}_3$ 50 µM EGTA/3.5 mM Mg^{2+}

ω = 55 960 Upm T = 4°C

□-□-□ E = 0.0 - 0.08 S = 1.89

○-○-○ E = 0.08 - 0.12 S = 2.68

△-△-△ E = 0.12 - 0.18 S = 3.20

Alle anderen Bedingungen sind wie bei Abb. 21 beschrieben.

Tabelle 13

Übersicht über die s-Werteder Troponin-Spezies, Tropomyosin sowie deren mögliche Komplexe

	P^1TI_2C		TI_2C		Tropomyosin
s_4^o	2.73		2.64		1.99
$s_{20,w}$	3.55 ± o.12		3.47 ± o.24		2.68 ± 11
	P^1TI_2C-Tm $+Mg^{2+}/+Ca^{2+}$		P^1TI_2C-Tm $+Mg^{2+}/+EGTA$		
s_4^o	2.o2	3.7o	1.93	2.74	3.92
$s_{20,w}$	2.7o ± o.o9	5.oo ± o.25	2.61 ± o.3o	3.55 ± o.15	5.2o ± o.36
	TI_2C-Tm $+Mg^{2+}/+Ca^{2+}$		TI_2C-Tm $+Mg^{2+}/+EGTA$		
s_4^o	1.98	3.38	1.88	2.41	3.36
$s_{20,w}$	2.67 ± o.18	4.56 ± o.35	2.53 ± o.o7	3.28 ± o.13	4.52 ± o.33

Die Sedimentationskonstanten wurden nach 2.2.14. und2.3.5. bestimmt. Die Standardabweichung berechnete sich aus 3 - 5 Ultrazentrifugationsläufen.

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung der Troponin-Komplexe P^1TI_2C und TI_2C

Um Troponin-Komplexe zweier verschiedener Phosphorylierungsgrade vergleichen zu können, war es notwendig, genau charakterisierte Ausgangsprodukte in die Hand zu bekommen.

Schon Perry et al (31) fanden 1 mol endogenes Phosphat pro mol Troponin bei der Präparation. Jedoch wurden ihnen während der Trennung des Troponins in seine Untereinheiten ca. 25% Phosphat ausgebaut. Das fast gesamte restliche Phosphat fand sich im Troponin T. Mit Phosphorylase b Kinase gelang es ihnen, am isolierten T die fehlenden o.25 mol/mol Troponin wieder einzubauen.

Die Autoren konnten zeigen, daß die alkalische Phosphatase aus E. coli das Phosphat am Troponin T ausbauen kann. Da der von ihnen benutzte Test aber nur auf das vorher eingebaute radioaktive Phosphat anspricht, ist unklar, ob das gesamte Phosphat im TnT hydrolysiert wurde.

Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Troponin weist ebenfalls einen Phosphatgehalt von ca. 1 mol/9o2oo g

Troponin auf, das nach ^{31}P-NMR-Messungen als frei rotierbares Serin-Phosphat vorliegt. Der Hauptteil dieses Phosphats (ca. 8o%) ist am Serin-1 des Troponin T gebunden, (54) die anderen 2o% an einem ebenfalls frei rotierbaren Serin in einer etwas anderen chemischen Umgebung (vgl. Abb. 3).

Lallemant et al. übernahmen die Methode des Dephosphorylierens von Perry et al.. Nach Rekonstitution der Aktomyosin-ATPase mit dephosphoryliertem Troponin fanden sie jedoch keine Änderung der Ca^{2+}-abhängigen Inhibierung dieses Enzymsystems gegenüber dem nicht dephosphoryliertem System. Abgesehen von der möglicherweise unvollständigen Dephosphorylierung könnten proteolytische Aktivitäten das Troponin T angedaut haben (13), so daß die Regulation der Aktomyosin-ATPase in diesem Test hauptsächlich auf den Komplex Troponin I_2C zurückzuführen sein könnte, und daß das Troponin T möglicherweise seine biologische Aktivität in dem rekonstituierten System verloren hat.

Nachdem es aufgrund der Arbeiten von Sperling et al. (13) gelungen war, von katheptischen Aktivitäten befreites Troponin zu isolieren, konnte das Troponin im Inkubationsan-

satz dephosphoryliert werden, ohne daß Proteolyse auftrat. Die im Laufe dieser Arbeit durchgeführten Tests zeigten, daß dies tatsächlich der Fall war. So zeigten die Versuche von 3.1., daß das Holo-Troponin nahezu vollständig dephosphoryliert und 3 Tage bei Raumtemperatur während der ^{31}P-NMR-Messungen inkubiert werden konnte, ohne daß sich Degradationserscheinungen zeigten.

Der Phosphattest nach Bartlett (48) zeigt zwar nach Dephosphorylierung einen restlichen Phosphatgehalt von 5 - 1o% an, aber dieses Phosphat ist im NMR-Spektrum nicht mehr auszumachen. Eine Möglichkeit wäre, daß das Phosphat nicht beweglich, sondern starr gebunden ist. Dies führt im NMR-Spektrum zu einer Linienverbreiterung des Phosphatsignals durch zusätzliche Dipol-Dipol-Wechselwirkung, sodaß das Signal der Auswertung entging.

Da nach der naßchemischen Phosphatbestimmung aber nur o.o5 - o.1 mol/9o 2oo g Phosphat gebunden sein können, ist die Wahrscheinlichkeit größer, daß es sich hier um Verunreinigungen durch unspezifisch an das Protein gebundenes Phosphat handelt.

4. 2. Einfluß des Serin-Phosphats des Troponin T auf die Ca^{2+}-Bindung

Die Ca^{2+}-Sensivität der Aktomyosin-ATPase wird über das Troponin I vom Troponin C vermittelt. Daher wurde zunächst dieser Parameter untersucht.

Die Ca^{2+}-Bindung am isolierten Troponin C ist viel beschrieben worden. (26, 27, 3o, 31)

Troponin C besitzt 6 Metall-Bindungsseiten, von denen je 2 spezifisch für Ca^{2+}, 2 spezifisch für Mg^{2+} sind und die letzten 2 sowohl Ca^{2+} als auch Mg^{2+} binden (2o).

Bei Übergang von Ca^{2+}-freiem Troponin C zu Troponin $C_{Ca^{2+}_2}$ ändert sich die Konformation des Troponin C (55), und zwar steigt der helikale Anteil des Proteins von 36% auf 52% (56). Nach Levine et al. (57) geht das Troponin C aus einem ungeordnetem Zustand in einen höher geordneten über, bei Aufnahme von 2 weiteren Ca^{2+}-Ionen treten nur noch lokal begrenzte Strukturänderungen auf. Die Autoren postulieren, daß die Besetzung der hoch affinen Bindungsseiten mit zweiwertigen Ionen im nativen Komplex essentiell für die Struktur sind. Dieses Postulat wird unterstützt durch die Arbeiten von Tsalkova et al. (63).

Danach liegt das Troponin C im metallfreiem Zustand als statistisches Knäuel vor. Bei Aufnahme von 2 Ca^{2+}-Ionen bilden sich erst helikale Bereiche aus, eventuell die Ca^{2+}/Mg^{2+}-Bindungsschleifen. Das erklärt die in 3. 3. 1. beobachtete Kooperativität der hoch affinen Ca^{2+}-Bindungsseiten, die auch Leavis et al. (64) bei Hydrolyse des TnC und Rekombination der Ca^{2+}-Bindungsdomänen III und IV beobachtete. Weshalb Potter und Gergely (2o) am TnC und am Holo-Troponinkomplex diese Kooperativität nicht fanden, ist unklar. Möglicherweise liegt bei ihnen das Troponin als Polymer vor, da die Konzentration an Troponin in ihren Ansätzen für die Metallion -Bindungsmessungen ca. 2oo mal so hoch ist wie in der vorliegenden Arbeit, und es keinen Hinweis gibt, daß das Troponin vor Einsetzen zur Metallion-Bindungsmessungen reduziert wurde.

Die niedrig affinen Ca^{2+}-Bindungsseiten regulieren die Aktomyosin-ATPase (2o).

Die vorliegende Arbeit ergab, daß die Ca^{2+}-Bindung der niedrig affinen Seiten des Holotroponins sich nicht von der des am Troponin T dephosphoryliertem Troponin-Komplex unterscheidet, so daß geschlossen werden kann, daß die

während das nicht phosphorylierte Troponin auf Ca^{2+}-Ausschüttung des sarkoplasmatischen Retikulums nur langsam reagiert. Ein Hinweis, daß dies der Fall sein könnte, geben die unter 3.2. beschriebenen Versuche, in denen das dephosphorylierte Troponin bedeutend längere Zeit zur Ca^{2+}-Gleichgewichtseinstellung benötigt als der phosphorylierte Komplex.

Es ist bekannt, daß Calmodulin die TnI-Hemmung der Aktomyosin-ATPase in ähnlicher Weise wie das Troponin C regulieren kann (65). Bei Ausschüttung von Ca^{2+} bindet das Calmodulin ans TnI, bei Erniedrigung des Ca^{2+}-Spiegels dissoziiert es vollständig vom TnI ab. Übertragen auf das TnC bedeutete das, daß es gleichgültig ist, in welchem Zustand sich das TnC bei niedriger freier Ca^{2+}-Konzentration befindet, solange die Wechelwirkung mit dem TnI weit genug erniedrigt wird. Somit scheint die Besetzung der Bindungsseiten mit Mg^{2+} nur der größeren Stabilität zu dienen. Ob die Besetzung der hoch affinen Bindungsseiten mit Mg^{2+} eine andere Konformationsumwandlung als die mit Ca^{2+} hervorruft, ist noch strittig. Johnson und Potter (58) behaupten, daß die Strukturänderung des Troponin C

auf Zugabe von Mg^{2+} die gleiche ist wie auf Zugabe von Ca^{2+}, während andere Arbeitsgruppen das Gegenteil behaupten (63,64). Ein Hinweis wie es in Wirklichkeit aussehen könnte, geben die Arbeiten von Sperling et al. (14). Vergleicht man die Phosphorylierungseigenschaften von mit Mg^{2+} besetztem Holotroponin, mit denen von mit Ca^{2+} besetztem Troponin, laufen die Reaktionen von Ca^{2+}-besetztem Troponin am Troponin T ab, die von Mg^{2+}-besetztem Troponin am Troponin I. Das gleiche Bild ergibt sich,wenn man die Proteolyse der Untereinheiten TnI und TnT in Abhängigkeit von der Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Besetzung des TnC vergleicht (13). Somit steht fest, daß bei Mg^{2+}-Besetzung des Troponins das TnI exponiert wird, und daß bei Ca^{2+}-Besetzung des Holotroponin-Komplexes das TnT exponiert wird. Dieses Gleichgewicht wird im Muskel durch die Phosphorylierung des Serin-1 des TnT zugunsten der TnI-Exponierung verschoben. Bei der im Muskel vorkommenden Mg^{2+}-Konzentration käme im Fall des Troponins TI_2C nur die Spezies vor,die das TnI fest gebunden hat. Damit das TnI an das Aktin binden kann,müßte das Troponin C denaturiert werden,oder wie im Fall des Calmodulin, vom Troponin-

Komplex dissoziieren. Im ersten Fall würde die Reaktion auf Ca^{2+} -Ausschüttung, wie beschrieben, zu langsam vonstatten gehen, im 2. Fall müßte das Troponin C in viel höherer Konzentration in der Muskelzelle vorkommen, damit die Regulation am TnI in wünschenswerter Weise ablaufen könnte. Die Phosphorylierung des TnT ergibt somit einen einschneidenden Vorteil bei der Muskel-Kontraktion, so daß sich dieser Mechanismus im Laufe der Entwicklung durchgesetzt hat.

4. 4. Mg^{2+}-Einfluß auf die Ca^{2+}- hoch affinen Bindungsstellen, allosterischer Effekt oder Kompetition ?

Phosphoryliertes und dephosphoryliertes Troponin unterscheiden sich nicht in ihrer Ca^{2+}- Bindung. Dephosphoryliert man Troponin, verschwindet die Kooperativität der Mg^{2+}-spezifischen Bindungsseiten, und noch auffälliger wird die Mg^{2+}-Bindung an die Ca^{2+}- hoch affinen Bindungsseiten reduziert. Wenn ein kompetitiver Mechanismus zwischen Ca^{2+} und Mg^{2+} an diesen Bindungsseiten vorliegt, sollten beide Ionen an dieselben Liganden gebunden sein. Es ist zunächst schwer vorstellbar, daß allein auf Dephosphorylieren der TnT- Untereinheit die Affinität für Mg^{2+} auf 1/3o fällt, während die Ca^{2+}-Bindung unbeeinflußt bleibt. Somit ließe sich vermuten, daß zumindest ein Teil der Liganden zur Bindung der beiden Ionensorten verschieden sind, daß also die scheinbare Erniedrigung der Ca^{2+}-Affinität der hoch affinen Bindungsseiten im Komplex P^1TI_2C auf allosterische Wechselwirkung des Mg^{2+} mit dem TnC zurückzuführen ist.

Daraus wäre zu folgern, daß die Ca^{2+}-Bindungskurve nur

bis zu einem endlichen Punkt, der der nahezu 100%igen Besetzung der allosterischen Mg^{2+}-Bindungsstelle entsprechen würde, nach höheren Ca^{2+}-Konzentrationen verschoben werden kann. Die Besetzung mit Mg^{2+} im Versuch 3.3.2. wäre im Falle des P^1TI_2C höher als 99.9%, im Versuch 3.3.3. ebenfalls höher als 99%. Das hieße, daß die Ca^{2+}-Bindungskurven aufeinanderfallen würden. Wie die Abbildungen 8 und 9 zeigen, ist dies aber nicht der Fall. Der Kurvenverlauf der Ca^{2+}-Bindung an das native Troponin folgt dem kompetitiven Modell.

Gleichzeitig mit den Bindungskurven wurden mehrere Versuche unternommen, die Gesamtzahl der gebundenen Metallionen im Holotroponin-Komplex auf über 6 zu bringen, was dem allosterischen Modell entsprechen würde.

Im Fall der Versuche von 3. 3. 3. betragen bei allen Bindungsmessungen die Mg^{2+}- Bindungsraten des Troponins 6 - $r_{Ca^{2+}}$, ebenso betrugen bei den Mg^{2+}-Bindungsmessungen von 3. 4. 2. die Ca^{2+}-Bindungsraten 6 - r_{Mg}.

Diese Ergebnisse stehen wiederum im Einklang mit dem Modell der Kompetition.

Auch eine dritte Beobachtung läßt sich so auslegen, daß die beiden Metallionen Ca^{2+} und Mg^{2+} um diese Bindungsplätze konkurrieren: Die Gleichungen des Programms ASSAM basieren auf der Annahme,daß die eingegebenen Ionensorten um die Bindungsplätze konkurrieren. Dabei wird angenommen, daß alle Ionen die gleichen Konformationsumwandlung im Protein bewirken, ein kooperatives Bindungsseitenpaar also seine Kooperativität unabhängig von der Art des besetzenden Metallions behält mit dem gleichen n_H^*. Die Bindungsparameter für die Metallionen-Bindungsseiten zeigen nemnach sehr gut, daß es sich bei den als spezifischen Seiten bekannten Bindungsorten um verschiedene Seiten für Ca^{2+} und Mg^{2+} handelt. (vgl. Tab. 1o und 11).Im Fall der Ca^{2+}/Mg^{2+}-Bindungsseiten zeigt sich beide Male ein Hill-Koeffizient von 2.o , der bei Kontrolle durch das Programm ASSAM bestätigt wird. Die scheinbare Erniedrigung von n_H im Fall von 3. 3. 2. rührt von der Mg^{2+}-Besetzung dieser Seite her, die in diesem Test ja nicht gesehen wird. Ein Versuch, eine allosterisch beeinflußte Ca^{2+}-Bindungskurve mit diesem Programm zu fitten, schlug fehl (66) .

*Hill-Koeffizient

Wie ist nun dieser Widerspruch , der zu Beginn dieses Kapitels aufgezeigt wurde, zu erklären? Es ist bekannt, daß die Elektronenhülle größerer Atome leichter deformierbar ist. Daraus folgt, daß das Mg^{2+} eine sehr viel höhere Genauigkeit an oktaedrischer Symetrie des Bindungsortes zur Ligandenbindung benötigt, während das Ca^{2+} auf die exakte Symmetrie zur Bindung weniger angewiesen ist (67). Die Störung, der Symmetrie der Liganden, die verursacht wird durch die zusätzliche Wechelwirkung des TnT, würde demnach schon genügen, die Affinität der Bindungsstellen zu Mg^{2+} drastisch zu erniedrigen, während die Ca^{2+}- Bindung unbeeinflußt bleibt. Ein ähnlicher Effekt kann beobachtet werden bei der Verlängerung des Rückgrates des Moleküls EDTA zu EGTA, wo die Mg^{2+}- Bindung bei gleichbleibender Ca^{2+}- Bindung drastisch erniedrigt wird(67). Das könnte übertragen auf das TnC bedeuten, daß der N-terminaleArm des TnT so in die Bindungsdomänen III und IV eingreift, daß die Bindungsschleifen auseinandergehen. Um diese Auflockerung der Struktur zu verhindern, könnte der N- terminale Arm des TnT am Serin-1 phosphoryliert worden sein.

Tafel II

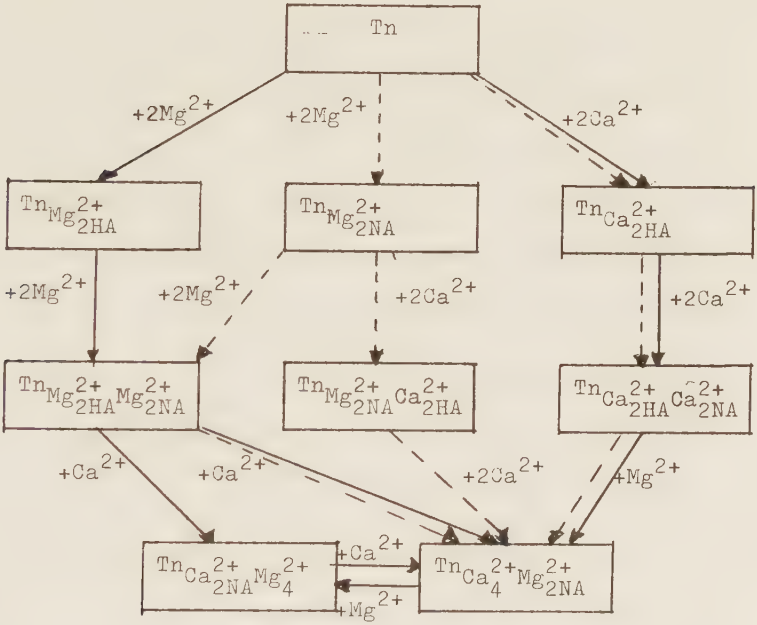
Metallionenaufnahme der Troponin-Komplexe

Reaktionen des P^1TI_2C	Reaktionen des TI_2C
Tn	metallfreies Troponin, TnC liegt als statistisches Knäuel vor
$Tn_{Ca^{2+}_{2HA}}$	TnC bildet die Ca^{2+}/Mg^{2+}-Bindungsschleifen aus, helikale Bereiche entstehen, TnI-Phosphorylierung ist gehemmt
$Tn_{Ca^{2+}_{2HA}Ca^{2+}_{2NA}}$	TnI wird von TnC fester gebunden, TnT ist exponiert
$Tn_{Mg^{2+}_{2HA}}$	TnC bildet helikale Bereiche an den Ca^{2+}/Mg^{2+}-Bindungsstellen, TnI ist exponiert
$Tn_{Mg^{2+}_{2NA}}$	nur bei TI_2C faßbar
$Tn_{Ca^{2+}_{NA}Mg^{2+}_{4}}$	TnI ist phosphorylierbar
$Tn_{Ca^{2+}_{4}Mg^{2+}_{2NA}}$	TnI wird von TnC fester gebunden, TnT ist exponiert, kein Phosphateinbau ins TnI

Bei den im Muskel vorherrschenden Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Konzentrationen kommen die Komplexe $P^1TI_2C_{Mg^{2+}_4}$, $P^1TI_2C_{Ca^{2+}_4Mg^{2+}_{2NA}}$, $TI_2C_{Mg^{2+}_{2NA}Ca^{2+}_{2HA}}$ und $TI_2C_{Mg^{2+}_{2NA}Ca^{2+}_4}$ vor.

Tafel II

Metallionenaufnahme der Troponin-Komplexe



4. 5. Verhalten der Troponin-Spezies bei der Komplexbildung mit Tropomyosin

Die Wechselwirkung der Troponin-Spezies $(P^1)TI_2C$, $(P^1)TI_2C_{Ca}{}^{2+}_{2}$, $(P^1)TI_2C_{Ca}{}^{2+}_{4}$, $P^1TI_2C_{Mg}{}^{2+}_{4}$, $TI_2C_{Mg}{}^{2+}_{3}$, $TI_2C_{Mg}{}^{2+}_{3}Ca^{2+}_{1}$ und $(P^1)TI_2C_{Mg}{}^{2+}_{2}Ca^{2+}_{2-4}$ mit Tropomyosin wurde mit Hilfe der Viskosimetrie vermessen, um das Verhalten dieser Troponin-Zustände besser beurteilen zu können. Die Bedingungen für die Troponin-Spezies $P^1TI_2C_{Mg}{}^{2+}_{2}$ und $TI_2C_{Mg}{}^{2+}_{2}$ waren schlecht zu erfassen, da die Dissoziationskonstanten der Mg^{2+}-Bindung sich nicht genug voneinander unterschieden (vgl. Tab. 11).

Zur Charakterisierung der Proteine wurde zunächst die Abhängigkeit der einzelnen Viskositäten von P^1TI_2C, TI_2C und Tropomyosin von der Proteinkonzentration gemessen.

Die beiden Troponin-Komplexe zeigten eine intrinsische Viskosität von o.18 dl/g und neigten im Gegensatz zu Tropomyosin bis ca. 2 mg/ml Proteinkonzentration nicht zum Aggregieren. Die intrinsische Viskosität ist etwas höher als der von der Arbeitsgruppe S. Ebashi (68) bestimmte Wert von o.12 dl/g, die in dieser Arbeit das Troponin als „Aggregationsfaktor" beschreibt. Auch der s-Wert des Troponins dieser Arbeitsgruppe liegt um o.5 niedriger als der in dieser Arbeit bestimm-

te. Aus den Daten von Ebashi ergibt sich nach Gl. (3o) ein um ca. 3o% niedrigeres Molekulargewicht. Zu dieser Zeit war die Wirkung katheptischer Aktivitäten auf Troponin noch nicht bekannt. (88)

Das reine Tropomyosin zeigt dort ähnliche viskometrische Eigenschaften, wie das in dieser Arbeit vermessene; trägt man die Daten von (68) um auf die reduzierte Viskosität, ergibt sich ebenfalls eine lineare Kurve. Die Autoren geben für das reine Tropomyosin leider keine intrinsische Viskosität an. Die intrinsische Viskosität des mit Troponin gemischten „ nativen Tropomyosin " wird mit o.52 dl/g angegeben (72). Da Ebashi (69) gezeigt hat, daß Troponin die Viskosität des Tropomyosins vergrößert, ist es fraglich,ob dieser Wert auch die intrinische Viskosität des reinen Tropomyosins ist. Der hier bestimmte Wert S_{2ow} für das Tropomyosin ist identisch mit dem in der Literatur beschriebene Wert (73). Die unter 3. 5. 1. beschriebenen Versuche dienten dazu, die Bedingungen für die größte Wechelwirkung zwischen Troponin und Tropomyosin festzustellen. Die sich ergebenden Kurven bei der Titration ähneln denen von Hitchcock et al. (71) mit dem Unterschied, daß die spezifische Viskosität allein

nicht, wie bei (71), bei höheren Troponinkonzentrationen zurück geht, sondern daß deren Anstieg dem Anstieg der Titrationskurve des Tropomyosins im 2. Teil der Abb. 14 entspricht.

Dieser wurde interpretiert als Viskositätsanstieg durch überschüssiges Troponin, sowohl P^1TI_2C als auch TI_2C zeigten diese Kurvencharakteristik. Der Grund, weshalb Autoren dieser Zusammenhang nicht aufgefallen ist, liegt einmal an der von ihnen beobachteten Viskositätserniedrigung des Troponins bei höheren Konzentrationen, zum zweiten an der 5 mal so niedrig angesetzten Tropomyosinkonzentrationen. Wie Abb. 14 zeigt, ist der Umschlagpunkt zwischen den Kurvenphasen umso ausgeprägter, je höher die eingesetzte Proteinkonzentration war. Aber auch bei den von den Autoren eingesetzten Konzentrationen kann der Punkt, wo freies Troponin auftritt, leidlich gut bestimmt werden. Er liegt bei ca. o.o6 mg/ml Troponinzugabe auf o.o5 mg/ml Tropomyosin, was überschlagmäßig ebenfalls auf einen 1:1-Komplex hinweist.

Auf Abb. 14 ist ebenfalls zu sehen, daß die Titrationskurve des Tropomyosins mit TI_2C steiler umschlägt als die des P^1TI_2C bei gleichen Proteinkonzentration.

Dies würde bedeuten, daß das TI_2C-Tn eine höhere Assoziationskonstante als P^1TI_2C-Tn aufweist. Um die Bedingungen für die maximale Wechelwirkung zwischen Tropomyosin und Troponin noch genauer eingrenzen zu können, erwies es sich als günstg,die Differenzen der nach 2. 3. 4. berechneten spezifischen Viskosität gegen den Molenbruch an Troponin aufzutragen. Die größte Differenz ergab sich im Fall des P^1TI_2C und im Fall des TI_2C bei einem Molenbruch von 5o% (Abb. 15). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche mit diesem Mischverhältnis von 1 mol Troponin zu 1 mol Tropomyosin durchgeführt.
Dabei fand sich bei voller Ca^{2+}-Besetzung der als anomal beschriebene Anstieg der Viskosität des Tropomyosins durch Troponin (73), der bei dem Komplex mit TI_2C deutlicher ausgeprägt ist als bei dem phosphoryliertem Komplex.
Bestimmte man in dieser Lösung den Sedimentationskoeffizienten der Komplexe, ergab sich für das phosphorylierte System ein $s_{2o,w}$-Wert von 5.1, der dem von Hartshorne et al. beschriebenen Komplex entspricht (77). Die Sedimentationsgeschwindigkeit des entsprechenden dephosphorylierten Komplexes war mit einem $s_{2o,w}$-Wert von 4.4 deutlich geringer.

Erniedrigte man die Ca^{2+}-Besetzung auf 2 - o mol Ca^{2+} pro mol Troponin-Tropomyosin, erschien das Material nicht einheitlich. Es trat eine zweite Komplexbildungsart auf, die sich im Kurvenverlauf deutlich von der oben beschriebenen unterschied und diese zurückdrängte. Diese Art Komplexbildung war vorherrschend, wenn das Troponin 4 mol Mg^{2+} pro mol gebunden hatte. Die intrinsische Viskosität dieses Komplexes ließ sich auf o.45 dl/g extrapolieren. Dieser Wert ist als intrinsische Viskosität für Tropomyosin beschrieben worden (71). Aufgrund der hier durchgeführten Messungen kann geschlossen werden, daß das Tropomyosin dieser Arbeitsgruppe mit Troponin verunreinigt war.

Erhöhte man in Anwesenheit von Mg^{2+} die Ca^{2+}-Besetzung, trat eine dritte Art Komplexbildung in Erscheinung, deren Verlauf der reduzierten Viskosität ähnlich der des reinen Tropomyosins linear ist. Dieser Komplex ist der allein vorherrschende, wenn das Troponin als $(P^1)TI_2C_{Ca_4^{2+}Mg_{2NA}^{2+}}$ vorliegt.

Auf Grund der im Muskel herrschenden Mg^{2+}-Konzentration sind die beiden zuletzt beschriebenen Komplexe für die Kontraktion relevant. Abb. 17 - 19 zeigen den Übergang von dem

$Tm\text{-}Tn_{Mg_4}^{2+}$ -Komplex zum $Tm\text{-}Tn_{Ca_4}^{2+}{}_{Mg_{2NA}}^{2+}$ bei Erhöhen der Ca^{2+}-Konzentration. Dabei tritt der letztere bei Bindung von 2 mol Ca^{2+} pro mol Troponin auf (Abb. 19), unter diesen Bedingungen sind in der Viskosimetrie beide Komplexe zu sehen, bei Besetzung der niedrig affinen Ca^{2+}-Seiten verschwindet der Komplex $Tm\text{-}Tn_{Mg_4}^{2+}$ vollständig.

Bei dem Versuch, diese beiden Komplexbildungsarten mit Hilfe der Ultrazentrifugation zu differenzieren, wurde ein leichter Überschuß an Tropomyosin zugegeben (3.6). In den Sedimentationsläufen mit $Tm\text{-}Tn_{Ca_4}^{2+}{}_{Mg_{2NA}}^{2+}$ traten zwei Stufen auf, die aufgrund des s-Wertes als Tropomyosin und als *(77)* $Tm\text{-}Tn_{Ca_4}^{2+}{}_{Mg_{2NA}}^{2+}$ identifiziert werden konnten. Bei Zugabe von EGTA trat ein zusätzlicher Komplex auf, der den gleichen s-Wert wie Troponin aufwies. Wenn der Komplex mit dem $s_{20,w}$ von 5.1 dem vorher beschriebenen Komplex entspricht, könnte diese Stufe, die in den Versuchen mit überschüssigem Ca^{2+} nicht auftritt, durch den $Tm\text{-}Tn_{Mg_4}^{2+}$ -Komplex hervorgerufen werden. Dafür spricht, daß in den Versuchen mit Ca^{2+} das freie Troponin ebenfalls nicht faßbar ist.

Daß die Stufe des freien Troponins nicht zu erkennen ist, kann folgende Gründe haben :

Als erste Stufe entsprechend dem am langsamsten sedimentierenden Protein erscheint das Tropomyosin mit relativ zu großer Stufe. Danach müßte als zweite Stufe die des freien Troponins erscheinen. Deren Höhe wird aufgrund des Johnson-Ogstone-Effektes verringert, so daß sie der Auswertung entging.

Bei Auftreten der Tm-$Tn_{Mg_4}^{2+}$ -Stufe verringerte sich gleichzeitig die Stufenhöhe des Komplexes mit dem $s_{20,w}$ von 5.1, was wiederum dafür spricht, das die Stufe mit dem $s_{20,w}$ von ca 3.5 tatsächlich den Tm-$Tn_{Mg_4}^{2+}$-Komplex repräsentiert.

Überträgt man dieses Reaktionsschema auf das TI_2C , sieht man, daß auch hier der Komplex Tm-$Tn_{Mg_{NA}^{2+}Ca_4^{2+}}$ und Tm-$Tn_{Mg_4}^{2+}$ auftritt, wobei man bedenken muß, daß der letztere nicht im Muskel vorkommen kann. Die Eigenschaften dieses Komplexes sind ähnlich denen des phosphorylierten Komplexes, während das Tm-$TI_2C_{Ca_4^{2+}Mg_{2NA}^{2+}}$ eine höhere reduzierte Viskosität und einen geringeren $s_{20,w}$ aufweist (vgl. Tab. 13). Dies weist auf ein anderes Aggregationsverhalten des dephosphorylierten Komplexes hin.

Mit Hilfe der Scheraga-Mandelkern-Gleichung wurde versucht, die Stöchiometrie der Tm-Tn-Komplexe genauer zu untersuchen. Nach 3.5.2. ergab sich ein Verhältnis von Troponin zu Tropomyosin von n mol zu n mol.

Die Molekulargewichte wurden aus der Aminosäurezusammensetzung der Einzelkomponenten bestimmt (74-76, 79), die partiellen spezifischen Volumen nach (61).

Aus den gemessenen $s_{20,w}$-Werten, der Dichte der Lösungen, der intrinsischen und der thermodynamischen Viskosität wurde das Molekulargewicht bestimmt, welches ein Vielfaches von 156 ooo sein muß.

Die beiden Troponin-Komplexe allein wiesen ein Molekulargewicht von ca. 9o 2oo auf, das Tropomyosin bei einem Molekulargewicht von 66 ooo einen Symmetriefaktor von ß = 2.68, was einem langgestreckten zigarrenförmigen Körper entspricht.

Setzt man die entsprechenden Werte für Tm-$Tn_{Mg}^{2+}_4$ ein, ergibt sich ein Molekulargewicht von 128 ooo bis 178 ooo je nach ß-Faktor. Bei dem Komplex Tm-$Tn_{Mg}^{2+}_4$ handelt es sich somit um einen 1 : 1 -Komplex sowohl beim phosphathaltigem als auch beim dephosphoryliertem System.

Dem Molgewicht nach könnte es sich auch um Tm_2 oder Tn_2 handeln. Gegen den Komplex Tm_2 spricht die Ca^{2+}-Sensitivität in der Viskosimetrie, gegen den Komplex Tn_2 der lineare Verlauf der reduzierten Viskosität des Tn, der Aggregation ausschließt.

Tab. 14

Molekulargewichte der Troponin-Komplexe, Tropomyosin und

Tm-$P^1TI_2C_{Mg_{2NA}}^{2+}Ca_4^{2+}$, Tm-$TI_2C_{Mg_{2NA}}^{2+}Ca_4^{2+}$, Tm-$P^1TI_2C_{Mg_4}^{2+}$ und Tm-TI_2C_{Mg}

Protein	s $1o^{13}$	$[\eta]$ in dl/g	$\bar{v}$ in ml/g	ß	M_r in g/mol
P^1TI_2C	3.55	o.183	o.718	2.15 $1o^6$	9o'2oo
TI_2C	3.47	o.182	o.718	2.15 $1o^6$	9o 2oo
Tropomyosin	2.68	o.28o	o.729	2.68 $1o^6$	66 ooo
P^1TI_2C-Tm (Mg^{2+}-Komplex)	3.5o	o.45o	o.723	2.35 $1o^6$	156 ooo
				2.15 $1o^6$	178 ooo
				2.68 $1o^6$	128 ooo
TI_2C-Tm (Mg^{2+}-Komplex)	3.47	o.45o	o.723	2.35 $1o^6$	156 ooo
				2.15 $1o^6$	178 ooo
				2.68 $1o^6$	128 ooo

Die Molekulargewichte der Proteine wurden nach 2.3.6. bestimmt. Die partiellen spezifischen Volumen wurden aus der Aminosäurezusammensetzung der Einzelkomponenten nach (61) bestimmt, der s-Wert nach 2.2.14. und 2.3.5., die intrinsische Viskosität nach 2.2.13. und 2.3.4. und die Dichte der Lösungen nach 2.2.15.

Der Komplex Tm-$Tn_{Ca^{2+}_4 Mg^{2+}_{2NA}}$ ist etwas schwieriger zu charakterisieren. Die Viskosität dieses Komplexes liegt fast genau auf der mit Gl.(17) berechneten Summenkurve der Proteine Tm und Tn. Dies sieht auf den ersten Blick so aus, als ob die Proteine nicht miteinander reagieren.

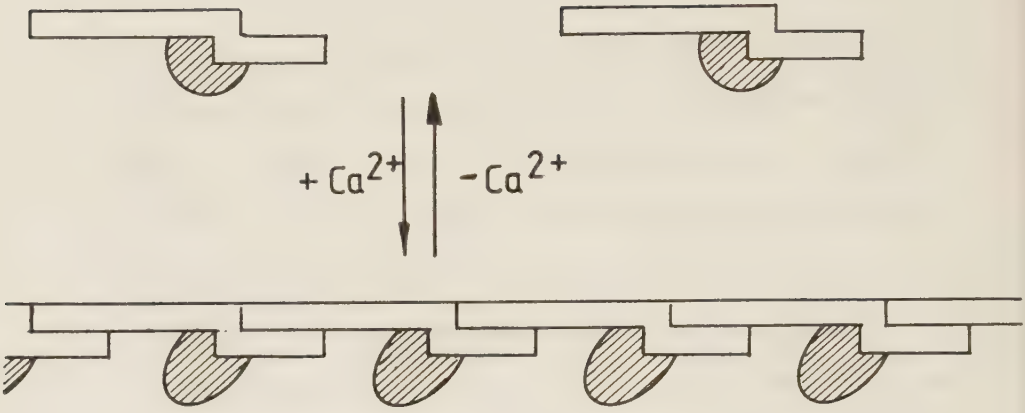
Die Sedimentationsexperimente ergeben jedoch einen Komplex, der eindeutig schneller sedimentiert als die Proteine allein. Dies kann nur so interpretiert werden, daß sich eine Tm-Tn-Spezies gebildet hat, die eine höhere intrinsiche Viskosität als das Tropomyosin allein gebildet hat, und deren Aggregationsverhalten dem des Tropomyosins entspricht (gleiche Steigung der reduzierten Viskosität nach Gl. (18), in der der quadratische Term die Wechselwirkung der Proteine miteinander wiedergibt).

Tm-$Tn_{Mg^{2+}_4}$ geht demnach bei Ca^{2+}-Aufnahme aus einem monomeren Komplex in einen filamentartigen über.

Um zu verstehen, wie diese Umwandlung die Aktin-Myosin-Wechselwirkung reguliert, muß man sich näher mit dem Tropomyosin befassen :

Tropomyosin ist ein langgestecktes, helikales Protein (8o), in dem die beiden identischen oder fast identischen Poly-

Tafel III



Übergang des monomeren Tm-$Tn_{Mg^{2+}_4}$ -Komplexes in den polymeren

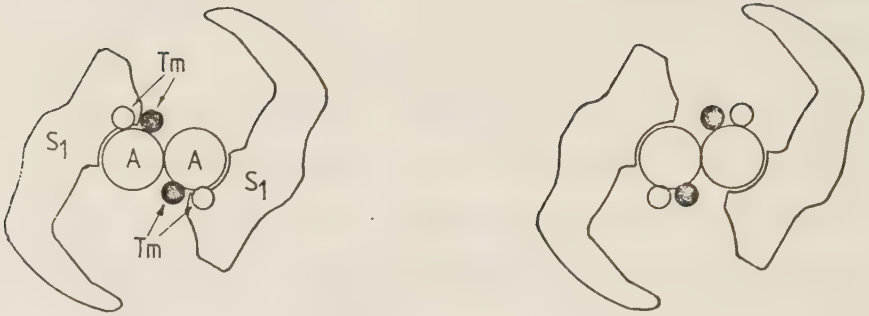
Tm-$Tn_{Mg^{2+}_2Ca^{2+}_4}$ -Komplex

weiß : Tropomyosin

schraffiert : Troponin

peptidketten parallel und in Register angeordnen sind (81 - 87). Dieser Doppelstrang ist in sich nochmals helikal gewunden (86, 62, 89). In Lösung aggregiert das Tropomyosin zu Filamenten durch Kopf-zu-Schwanz-Aggregation. Dabei überlappt das 4o nm lange Molekül um 8 - 9 Aminosäurereste, das entspricht etwa 1.5 nm (84, 87). Diese Tropomyosin-Kette liegt beidseitig entlang einer Rinne, die von 14 Aktin-Molekülen gebildet wird, die wiederum helikal angeordnet sind.
Nach Huxley (2) rückt das Tropomyosin von einer die Aktin-Myosin-Wechselwirkung sterisch hindernden Position tiefer in das Zentrum der Aktin-Rinne, während es nach Seymour und O'Brien (9o)lediglich über Konformationsänderungen des Aktins die Aktomyosin-ATPase aktiviert wird (Tafel IV). Welcher dieser beiden Mechanismen zutrifft, ist für die vorliegende Arbeit nicht relevant.
Die Verkürzung des Tm-Tn-Komplexes wurde von (91) berechnet. Danach liegt das Tropomyosin in ruhenden Muskel um 65^{o} - $7o^{o}$ von dem Zentrum der Aktin-Rinne entfernt, während es im aktiven Muskel um 45^{o} - $5o^{o}$ von dem Zentrum entfernt liegt. Dies würde einer Verkürzung des einzelnen Tropomyosin-Moleküls um 1.5 nm entsprechen, die Autoren postulieren, daß dies

Tafel IV



Position des Tropomyosins im dünnen Muskelfilament

links : Modell nach Huxley (2)
Im ruhenden Muskel blockiert das Tropomyosin (weißer Kreis) sterisch die Wechselwirkung des Aktins (A) mit dem Myosin (S_1).
rechts : Modell nach Seymour et al. (9o)
Das Tropomyosin ist auf der entgegengesetzten Seite der Aktinrinne gebunden. Es kann nur über Konformationsänderung des Aktins die Aktomyosin-ATPase regulieren.
schwarz : Position des Tropomyosins im aktiven Muskel.
Bei Kontraktion wird in beiden Modellen das Tropomyosin in die Aktin-Rinne gezogen.

durch zusätzliches Verdrillen der Tropomyosin-Helix geschieht. Deren Berechnung ergab aber nur eine Änderung von o.5 nm.

Die in dieser Arbeit gefundene Ca^{2+}-abhängige Polymerisation des Tm-Tn-Komplexes ergibt bei Kopf-zu-Schwanz-Aggregation eine Längenänderung von genau 1.5 nm pro Tm-Tn-Einheit .

Die Dissoziation des monomeren Tm-$Tn_{Mg}{}^{2+}_{4}$ vom Aktin-Komplex im ruhenden Muskel wird durch die Bindung dieses Komplexes über das TnI ans Aktin verhindert.

Bei Ca^{2+}-Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulums wird bei gleichzeitiger Polymerisation des Tm-Tn-Komplexes die Wechselwirkung des TnI mit dem Aktin aufgehoben, so daß das Tm-Tn-Filament sich auf das Zentrum der von den Aktin-Molekülen gebildeten Rinne zubewegen kann.

5. Zusammenfassung

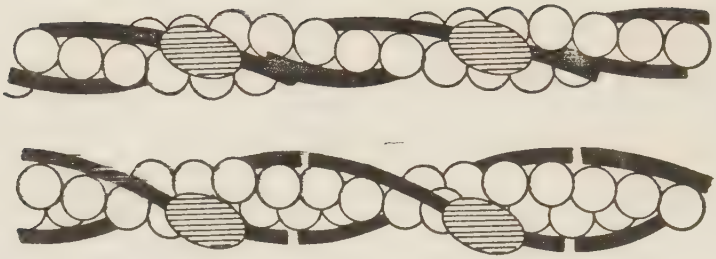
Die Tabelle auf der nächsten Seite gibt die Ergebnisse des Vergleichs der Troponin-Komplexe P^1TI_2C und TI_2C wieder. Der Komplex $Tm\text{-}Tn_{Mg}{}^{2+}_{4}$ geht bei Aufnahme von Ca^{2+} von einem monomeren Zustand in einen filamentartigen über unter Verkürzung um 1.5 nm pro 4o nm. Dadurch wird er tiefer in die Aktin-Rinne gezogen und gibt die Aktomyosin-ATPase frei. Dem phosphoryliertem Troponin ist es im Gegensatz zum dephosphoryliertem Troponin möglich, mit Tropomyosin je nach Ca^{2+}-Konzentration im Muskel zwei verschiedene Komplexe zu bilden, die das von Huxley (2) beschriebene Verhalten gegenüber Aktin haben.

Tabelle 14

Vergleich der Eigenschaften der Troponin-Komplexe P^1TI_2C und TI_2C

untersuchter Parameter	P^1TI_2C	TI_2C
Ca^{2+}-Bindung an die Ca^{2+}-spezifischen Bindungsseiten	identisch	
Ca^{2+}-Bindung an die Ca^{2+}/Mg^{2+}-Seiten	identisch	
Mg^{2+}-Bindung an die Mg^{2+}-spezifischen Bindungsseiten	positiv kooperativ	nicht kooperativ
Mg^{2+}-Bindung an die Ca^{2+}/Mg^{2+}-Seiten	hoch affin positiv kooperativ	niedrig affin nicht kooperativ
intrinsische Viskosität	identisch	
reduzierte Viskosität	identisch	
$S_{20,w}$	identisch	
Metallionenbesetzung im ruhenden Muskel	$Tn_{Mg^{2+}_4}$	$Tn_{Ca^{2+}_2Mg^{2+}_2}$
Metallionenbesetzung im aktiven Muskel	$Tn_{Ca^{2+}_4Mg^{2+}_2}$	

Tafel V



Modell des dünnen Filamentes

Aktin bildet eine Helix, in deren Rinne der Troponin-Tropomyosin-Strang verläuft.

oben : aktiver Muskel $(Tm\text{-}Tn_{Mg^{2+}_2 Ca^{2+}_4})_n$

unten : ruhender Muskel $n\ Tm\text{-}Tn_{Mg^{2+}_4}$

Im ruhenden Muskel wird das Tropomyosin durch Troponin über Bindung des TnI ans Aktin am dünnen Filament gehalten.

weiß : Aktin

schwarz : Tm-Tn

6. LITERATUR

(1) M. Kilimann (1979)
Dissertation, Abt. für Physiol. Chem. I
Ruhr-Universität Bochum

(2) H.E. Huxley (1972)
The Structure And Function of Muscle Vol. I
Structure Part 1
G.H. Bourne ed., Acad. Press New York & London

(3) H.E. Huxley (1957)
Biophys. Biochem. Cyt. 3 , 631

(4) A.G. Szent-Györgyi, D.Mazia und A.Szent-Györgyi (1955)
Biochem. Biophys. Acta 16, 339

(5) S. Lowey, H.S. Slater, A.G. Weeds und H.Baker (1969)
J. Mol. Biol. 42, 1

(6) J. Hanson und J. Lowy (1963)
j. Mol. Biol. 6, 46

(7) M. Elzinga, J.H. Collins, W.M. Kuehl und R.S.Adelstein (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2 687

(8) S. Ebashi, A. Kodama und F. Ebashi (1968)
J. Biochem. Tokyo 64, 465

(9) M.D. Pato und L.B. Smillie (1978)
FEBS-Lett. 87, 95

(1o) M.1. Graeser und J. Gergely (1971)
J. Biol. Chem. 246, 4 226

(11) W. Drabikowski, E. Nowak, B. Barylko und R.Dabrowska (1972)
Cold Spring Harbor Synp. Quant. Biol.37, 245

(12) A.C. Murray und C.M. Kay (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 237

(13) J.R. Pearlstone, M.R. Carpenter und L.B. Smille (1977)
J. Biol. Chem. 252, 983

(14) J.E. Sperling, K. Feldmann, H. Meyer, U. Jahnke (1979)
und L.M.G. Heilmeyer jr.
Eur. J. Biochem. 1o1, 581

(15) S.V. Perry, H.A. Cole, J.F. Head and J.P. Trayer (1972)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 251

(16) J.M. Wilkinson, S.V. Perry, H.A. Cole,and J.P. Trayer (1972)
J. Biochem. 127, 215

(17) J.M. Wilkinson and R.J.A. Grand (1975)
Biochem. J. 149, 493

(18) D.J. Hartshorne und H.Y. Pyun (1971)
Biochim. Biophys Acta 229, 698

(19) M.L. Greaser and J. Gergely (1973)
J. Biol. Chem. 248, 2 125

(2o) J.D. Potter and J. Gergely (1975)
J. Biol. Chem. 25o, 4 628

(21) W.D. McCubbin, R.S. Mani,and C.M. Kay (1974)
Biochemistry 13, 2 689

(22) J.P. van Eerd and K. Takahashi (1975)
Biochem. Biophys.Res. Commun. 64, 122

(23) S. Ebashi (196o)
J. Biochem. (Tokyo) 48, 15o

(24) S. Ebashi (1961)
Supp. Prog. Theor. Phys. 17, 37

(25) A.G. Szent-György in : (1951)
The Chemistry of Muscular Contraction, pp. 146
Acad. Press New York

(26) S. Ebashi, S. Onishi, S. Abe,and K. Maruyama (1974)
in :
Calcium Binding Proteins
W. Drabikowski, H. Strzelecko-Golaszewska, E. Carafoli eds.
PWN-Polish Scientific Publishers, Warszawa
Elsevier Scientific Publ. Company, Amsterdam

(27) S. Onishi, K. Maruyama,and S. Ebashi (1975)
J. Biochem. (Tokyo) 78, 73

(28) T. Iio, K. Mihashi,and H. Kondo (1976)
J. Biochem. (Tokyo) 79, 689

(29) K.B. Seamon, D.J. Hartshorne,and A.A. Bothner-By (1977)
Biochemistry 16, 4 o39

(3o) T. Wakayabashi and S. Ebashi (1968)
J. Biochem. (Tokyo).64, 731

(31) S. Ebashi in : (1974)
Lipman Symp. : Energy, Biosynthesis and Regulation in Biology, pp. 165
Verlag Walter de Gruyter, Berlin und New York

(32) S.V. Perry and H.A. Cole (1973)
Biochem. J. 131, 425

(33) S.V. Perry, H.A. Cole, A.J.G. Moir, M. Morgan, and E. Pires (1975)
Proc. FEBS Meet. 31, 163

(34) S.V. Perry and H.A. Cole (1974)
Biochem. J. 141, 733

(35) C. Lallemant, K. Seraydarian, W.F.H.M. Mommaerts, and M. Suh (1975)
Arch. Biochem. Biophys. 169, 367

(36) G. Dickneite, H.P. Jennissen, and L.M.G. Heilmeyer jr. (1978)
FEBS Lett. 87, 297

(37) T.S. Huang, D.B. Bylund, J.T. Stull, and E.G. Krebs (1974)
FEBS Lett. 42, 249

(38) A.J.G. Moir and S.V. Perry (1977)
Biochem. J. 167, 333

(39) J.R. Pearlstone, M.R. Carpenter, P. Johnson, and L.B. Smillie (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1902

(40) A.J.G. Moir, J.M. Wilkinson, and S.V. Perry (1974)
FEBS Lett. 42, 253

(41) H.A. Cole, N. Frearson, A.J.G. Moir, S.V. Perry, and R.J. Solaro (1978)
in :
Cardiac Structure And Metabolism Vol. 11,pp. 11o
T. Kobayashi, T. Sano,and N.S. Dhalla eds.
University Park Press, Baltimore

(42) H. Ribolow, K. Barany, A. Steinschneider,and M. Barany (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 179, 81

(43) C. Rubio, C. Bailey,and C. Villar-Palasi (1975)
J. Cycl. Nucl. Res. 1, 143

(44) J.E. Sperling (1977)
Abt. Physiol. Chem. I, Ruhr-Universität Bochum

(45) S. Ebashi, T. Wakayabashi,and F. Ebashi (1971)
J. Biochem. (Tokyo) 69, 441

(46) K. Weber and M. Osborn (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4 4o6

(47) O.H. Lowrey, N.J. Rosebrough,and R.J. Randall(1951)
J. Biol. Chem. 193, 265

(48) G.R. Bartlett (1959)
J. Biol. Chem. 234, 466

(49) M. Kilimann and L.H.G. Heilmeyer jr. (1977)
Eur. J. Biochem. 73, 191

(50) D.D. Perrin and I.G. Sayce (1967)
Talanta 14, 833

(51) L.G. Sillen and A.E. Martell (1971)
Stability Constants of Metal Ion Komplexes Supp. 1,
Spec. Publ. No. 25
The Chemical Society, London

(52) A.V. Hill (1910)
J. Physiol. 90, IV-VII, London

(53) H. Kalbitzer and D. Stehlik (1979)
Z. Naturforschung 34, 757

(54) J.R. Pearlstone, P. Johnson, M.R. Carpenter, (1977)
and L.B. Smillie
J. Biol. Chem. 252, 983

(55) T. Iio, K. Mihashi, and H. Kondo (1978)
J. Biochem. 83, 961

(56) J.P. van Eerd and Y. Kawasaki (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 859

(57) B.A. Levine, D. Mercola, D. Coffman and J.M. Thornton (1977)
J. Mol. Biol. 115, 743

(58) J.D. Johnston and J.D. Potter (1978)
J. Biol. Chem. 253, 3 775

(59) R.K. Gupta ans R.D. Moore (198o)
J. Biol. Chem. 255, 3 987

(6o) J.T. Stull, C.O. Bronstrom and E.G. Krebs (1972)
J. Biol. Chem. 247, 5 272

(61) E.J. Cohn and J.T. Edsall in (1943)
Protein Amino Acids And Peptides pp. 37o
E.J. Cohn and J.T. Edsall ed.
Reinold Publ. Corp. New York

(62) D. Stone, J. Sodek, P. Johnson and L.B. Smillie (1975)
Fed. Eur. Biochem. Soc. Meet. (Proc) 31, 3 8oo

(63) T.N. Tsalkowa and P.L. Privalov (198o)
Biochem. Biophys. Acta 624, 196

(64) P.C. Leavis, S.S. Rosenfeld, J. Gergely, Z. Grabarek,and W. Drabikowski (1978)
J. Biol. Chem. 253, 5 452

(65) L. Castellani, E.P. Morris, and E.J. O'Brien (198o)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 558

(66) Heilmeyer et al. (1981)
submitted

(67) R.J.P. Williams in : (1977)
Ca^{2+}-binding Proteins and Ca^{2+}-Function
R.H. Wassermann, R.A. Corradino, E. Carafoli
R.H. Kretsinger, D.H. MacLennan,and F.L. Siegel
eds. pp 3
North Holland, New York, Amsterdam, Oxford

(68) S. Ebashi and A. Kodama (1965)
J. Biochem. (Tokyo) 58, 1o7

(69) S. Ebashi and A. Kodama (1966)
J. Biochem. (Tokyo) 59, 425

(7o) H. Sugita, Y. Okumura,and K. Aycu (1969)
J. Biochem.(Tokyo) 65, 971

(71) S.E. Hitchcock, H.E. Huxley,and A.G. Szent-Gyorgi (1973)
J. Mol. Biol. 8o, 825

(72) E.F. Woods (1969)
Biochemistry 8, 4 336

(73) W.D. McCubbin, R.F. Kouba,and C.M. Kay (1967)
Biochemistry 6, 2 417

(74) J.R. Pearlstone, M.R. Carpenter, P. Johnson and L.B. Smillie (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1 9o2

(75) R.J.A. Grand, J.M. Wilkinson,and L.E. Mole (1976)
Biochem. J. 159, 633

(76) J.H. Collins (1974)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 301

(77) D.J. Hartshorne and H. Mueller (1969)

B.B.A. 173, 301

(78) M.D. Pato and L.B. Smillie (1978)

FEBS-Letters 87, 95

(79) D. Stone, J. Sodek, P. Johnson, and L.B. Smillie (1975)

Proc. IX Fets Meet.

Proteins of Contractile Systems 31, 125

E.M.A. Biro ed.

Akademiai Kiado, Budapest and North Holland Publ. Corp. Amsterdam

(80) C. Cohen and A.G. Szent-Gyorgi (1957)

J. Am. Chem. Soc. 79, 248

(81) R.S. Hodges and L.B. Smillie (1970)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 987

(82) P. Cummings and S.V. Perry (1974)
Biochem. J. 141, 43

(83) D.L.D. Caspar, C. Cohen,and W. Longley (1969)
J. Mol. Biol. 41, 87

(84) P. Johnson and L.B. Smillie (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 1 316

(85) S.S. Lehrer (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3 377

(86) A.D. McLachlan and M. Steward (1975)
J. Mol. Biol. 98, 293

(87) M. Steward (1975)
FEBS-Lett. 53, 5

(88) S. Ebashi and M. Endo (1968)
Progr. Biophys. Mol. Biol. 18, 123

(89) J. Sodek, R.S. Hodges, L.B. Smillie, and L. Jurasek (1972)

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3 800

(90) J. Seymour and E.J. O'Brien (1980)

Nature 283, 680

(91) D.A.D. Parry and J. M. Squire (1973)

J. Mol. Biol 75, 33

```
*DRPROTOKOLL
 1 ZUSTAND      = EIN
*DAUSGABE
 1 DATEI        = ASSAM
 2 MODUS        = ON

START DAUSGABE (14,11)

INHALT DER DATEI ASSAM (0001,00) IN DATENBASIS &SYS3

C       PROGRAMM ASSAM
        INTEGER VAR,OLIM,HVAR
        REAL NY
        DOUBLE PRECISION FQS,GR(17),GG(17,17),H(289),HS( 80)
        DOUBLE PRECISION SIGMA,FQSO
        DOUBLE PRECISION FUNCT,UPDOT
        DIMENSION BHX(17),PX(17)
        DIMENSION UUX(17)
        COMMON/ABL/UX(17),HX(17),FQS
        COMMON/UP/VAR
        COMMON/T/TNY
        COMMON/SKA/LISTE(17),Z(17)
        COMMON/HV/HVAR,IND
        COMMON/IR/IRR
        COMMON/FUN/GEMAX,IPROG,ND,PROT( 80),YTOT( 80),ZTOT( 80),
       -NY( 80),C(   80),GEW( 80)
        SUM=0.0
        READ(8,  1) IPROG
        READ(8,  1) ND
        READ(8,  1) VAR
        READ(8,  1) OLIM
        READ(8,  1) IGRA
        READ(8,  1 ) GEMAX
        WRITE(4,100)
        WRITE(4,112) IPROG,ND,VAR,OLIM
        WRITE(4,407) GEMAX
        WRITE(4,904) IGRA
        READ(8, 10)(HX(I),I=1,VAR)
        WRITE(4,121)
        WRITE(4,105)(HX(I),I=1,VAR)
        READ(8,  1 ) P
        WRITE(4,4034) P
        READ(8,10 )(LISTE(I),I=1,VAR)
        WRITE(4,3081)
        WRITE(4,3082)(LISTE(I),I=1,VAR)
        READ(8,  4)(Z(I),I=1,17)
        WRITE(4,115)
        WRITE(4,3083)
        WRITE(4,105)(Z(I),I=1,4)
        WRITE(4,3087)
        WRITE(4,105)(Z(I),I=5,8)
        WRITE(4,3085)
        WRITE(4,105)(Z(I),I=9,12)
        WRITE(4,3088)
        WRITE(4,105)(Z(I),I=13,16)
        WRITE(4,3086)
        WRITE(4,105) Z(17)
        READ(8,10 )(GEW(I),I=1,ND)
        WRITE(4,305)
        WRITE(4,308)(GEW(I),I=1,ND)
        GOTO (1200,1201,1202),IPROG
 1200 CONTINUE
```

```
 787  161002 KF23-1  JAHNKE        073720 F<Z=          06.02.81 1V19180

INHALT DER DATEI ASSA1 (0001,00) IN DATEIBASIS &3F0D4

      WRITE(4,411)
      DO 201 I=1,ND
      READ(8,  2) NY(I),C(I)
      WRITE(4,303)NY(I),C(I)
  201 CONTINUE
      WRITE(4,414)
      GOTO 2011
 1201 CONTINUE
      WRITE(4,412)
      DO2010 I=1,ND
      READ(8,  4) NY(I),C(I),PROT(I),YTOT(I)
      WRITE(4,303)NY(I),C(I),PROT(I),YTOT(I)
 2010 CONTINUE
      WRITE(4,415)
      GOTO 2011
 1202 CONTINUE
      WRITE(4,410)
      DO 2014 I=1,ND
      READ(8,  5) NY(I),C(I),PROT(I),YTOT(I),ZTOT(I)
    1 FORMAT(8)
    2 FORMAT(2B)
    4 FORMAT(4B)
    5 FORMAT(5B)
   10 FORMAT(10B)
      WRITE(4,303) NY(I),C(I),PROT(I),YTOT(I),ZTOT(I)
 2014 CONTINUE
      WRITE(4,416)
 2011 CONTINUE
      WRITE(4,413)
 2015 CONTINUE
      IRR=0
      DO 240 I=1,VAR
      J=LISTE(I)
      BHX(I)=HX(I)
      UX(I)=Z(J)
      PX(I)=UX(I)
  240 CONTINUE
      DO 203 I=1,VAR
      HX(I)=BHX(I)*UX(I)
  203 CONTINUE
      HVAR=0
      FQS=FUNCT(UX)
      WRITE(4,878) FQS
      FQSO=FQS
      FMIN=FQS
      IRR=2
      HVAR=1
      IN=0
      IHG=IGRA
      IF (OLIM.EQ.0) GOTO4041
  404 CONTINUE
      FQS=FUNCT(UX)
  403 CONTINUE
      IF (FQS.GT.FMIN) GOTO 4500
      DO 4501 I=1,VAR
 4501 PX(I)=UX(I)
      FMIN=FQS
 4500 CONTINUE
 4038 CONTINUE
      IF (IN.GE.OLIM) GOTO 4041
```

INHALT DER DATEI ASSAM (0001,00) IN DATEIBASIS &5[illegible]

```
      IN=IN+1
      WRITE(4,106)(UX(I),I=1,VAR)
      CALL ABLEIT(VAR,GR,GG)
      WRITE(4,125)IN,ING,FQS
      FQSO=FQS
      SGG=0.0
      SGR=0.0
      DO 4032 I=1,VAR
      SGR=SGR+GR(I)*GR(I)
 4032 CONTINUE
      GOTO (4035,4036,4037),IGRA
 4035 CONTINUE
      DO 4043 I=1,VAR
      SGG=SGG+GG(I,I)*GG(I,I)
 4043 CONTINUE
      IF(SGR.LT.SGG) GOTO 4031
 4036 CONTINUE
      DO 207 I=1,VAR
      UUX(I)=UX(I)
      UX(I)=UX(I)-P*GR(I)/DABS(GR(I))*HX(I)
      IF(UX(I).LE.0) UX(I)=UUX(I)/2.0
      HX(I)=BHX(I)*UX(I)
  207 CONTINUE
      ING=2
  209 CONTINUE
      FQS=FUNCT(UX)
      IF (FQS.LT.FQSO) GOTO 403
      DO 2149 I=1,VAR
      UX(I)=UUX(I)
      HX(I)=BHX(I)*UX(I)
 2149 CONTINUE
      GOTO 4031
 4037 CONTINUE
      DO 208 I=1,VAR
      UUX(I)=UX(I)
      UX(I)=UX(I)-P*GR(I)*HX(I)
      IF(UX(I).LE.0.) UX(I)=UUX(I)/2.0
      HX(I)=BHX(I)*UX(I)
  208 CONTINUE
      ING=3
      GOTO 209
 4031 CALL GAUSS(VAR,GG)
      K=1
      DO 286 I=1,VAR
      H(K)=GG(I,I)
      IVAR=VAR-I
      IF (IVAR) 288,286,288
  288 DO 205 J=1,IVAR
      M=I+J
      L=K+J
  205 H(L)=GG(I,M)
      K=K+VAR-I+1
  286 CONTINUE
      DO 8288 I=1,VAR
 8288 HS(I)=-UPDOT(H,GR,I)
      DO 2707 I=1,VAR
      UX(I)=UX(I)+HS(I)*HX(I)
      IF ( UX(I).LE.0.) UX(I)=(UX(I)-HS(I)*HX(I))/2.0
      HX(I)=BHX(I)*UX(I)
 2707 CONTINUE
```

INHALT DER DATEI ASSAM (0001,00) IN DATENBASIS &STDDA

```
      ING=1
      GOTO 404
 4041 HVAR=0
      DO 4140 I=1,VAR
 4140 UX(I)=PX(I)
      FQS=FUNCT(UX)
      SUMGEW=0.0
      DO 1234 I=1,ND
 1234 SUMGEW=SUMGEW+GEW(I)
      SIGMA=FQS/SUMGEW
      SIGMA=DSQRT(SIGMA)
      WRITE(4,3084) SIGMA
      DO 4042 I=1,VAR
      J=LISTE(I)
 4042 Z(J)=UX(I)
      WRITE(4,116)
      WRITE(4,3083)
      WRITE(4,105)(Z(I),I=1,4)
      WRITE(4,3087)
      WRITE(4,105)(Z(I),I=5,8)
      WRITE(4,3085)
      WRITE(4,105)(Z(I),I=9,12)
      WRITE(4,3088)
      WRITE(4,105)(Z(I),I=13,16)
      WRITE(4,3086)
      WRITE(4,105) Z(17)
  100 FORMAT(//X,4('-'),'IPROG',8('-'),'ND',7('-'),'VAR',6('-'),'DLIM',
     -25('-'))
  104 FORMAT(I7I4)
  105 FORMAT(4E10.3)
  106 FORMAT(' UX(I)   ',4E10.3)
  112 FORMAT(6X,I4,6X,I4,6X,I4,6X,I4)
  115 FORMAT(//X,14('-'),'ANFANGSWERTE Z(I)',33('-'))
  116 FORMAT(//X,18('-'),'FITWERTE Z(I)',33('-'))
  121 FORMAT(//X,14('-'),'SCHRITTWEITE HX(I)',32('-')/)
  125 FORMAT(' DURCHGANG',I5,'---METHODE',I5,'---FEHLERQUADRAT'
     -'SUMME   ',E10.3)
  302 FORMAT(8E10.3)
  303 FORMAT(8(E10.3,' *'))
  305 FORMAT(//X,14('-'),'WICHTUNG DER MESSWERTE',28('-')/)
  308 FORMAT(I1 ,20B(F4.2,1X))
  309 FORMAT(10F5.2)
  406 FORMAT(I4)
  407 FORMAT(/X,14('-'),'MAX.FUNKTIONSWERT GEMAX ',5X,E10.3,11('-'))
  410 FORMAT(//5X,'NY(I) *',6X,'C(I) *',3X,'DRJT(I) *',3X,
     -'YTOT(I) *',3X,'ZTOT(I) *',/X,59('*'))
  411 FORMAT(//5X,'NY(I) *',6X,'C(1) *',/X,23('*'))
  412 FORMAT(//5X,'NY(I) *',6X,'C(I) *',3X,'DRJT(I) *',3X,
     -'YTOT(I) *',/X,47('*'))
  413 FORMAT(/X,64('*'),//)
  414 FORMAT(X,23('*')//)
  415 FORMAT(X,47('*')//)
  416 FORMAT(X,59('*')//)
  878 FORMAT(/1H ,'FEHLERQUADRATSUMME',4X,E10.3//)
  904 FORMAT(/X,14('-'),'IGRA ',I5,40('-'))
 3081 FORMAT(/X,14('-'),'LISTE ZUM UMORDNEN DER PARAMETER Z(I) ',
     -12('-')/)
 3083 FORMAT(/4X,'N1',8X,'N2',8X,'N3',8X,'N4')
 3087 FORMAT(/4X,'K1',8X,'K2',8X,'K3',8X,'K4')
 3085 FORMAT(/4X,'L1',8X,'L2',8X,'L3',8X,'L4')
```

```
 787  161002 KF23-1  JAHNKE        078720 F<Z=          05.02.81 MV191803

INHALT DER DATEI ASSA1 (0001,00) IN DATENBASIS &STD03

 3088 FORMAT(/4X,'M1',8X,'M2',8X,'M3',8X,'M4')
 3086 FORMAT(/2X,'ALPHA')
 3082 FORMAT(IH ,10I4)
 4034 FORMAT(/X,14('-'),'FAKTOR P IN GRADIENTENMETHODE      ',E10.3,
     - 8('-'))
 6013 FORMAT(E10.3)
 3084 FORMAT(//15X,'STANDARTABWEICHUNG D. MESSPUNKTE',5X,E10.3)
      STOP
      END
C     BERECHNUNG DER MATRIX DER 1.-TEN ABLEITUNG GG
C      UND DES GRADVEKTORS GR
      SUBROUTINE ABLEIT(N,GT,GS)
      DOUBLE PRECISION FQS
      DOUBLE PRECISION GT(17),GS(17,17),FQ,FP,FM,F2P
      DOUBLE PRECISION FUNCT,UPDOT
      DIMENSION Y(17)
      COMMON/ABL/UX(17),HX(17),FQS
      DO 556 I=1,N
      DO 555 J=1,N
  555  GS(I,J)=0.
  556 CONTINUE
      DO 666 I=1,N
  666  GT(I)=0.
      DO 215 I=1,N
  215  Y(I)=UX(I)
      FQ=FQS
      DO 216 I=1,N
      Y(I)=UX(I)+HX(I)
      FP=FUNCT(Y)
      Y(I)=UX(I)-HX(I)
       FM=FUNCT(Y)
       Y(I)=UX(I)
       GT(I)=(FP-FM)/(2*FQ)
  216  GS(I,I)=(FP+FM-2*FQ)/FQ
      IF(N.LT.2) GOTO 219
       M=N-1
       DO 217 I=1,M
       K=I+1
       DO 218 J=K,N
       Y(I)=UX(I)+HX(I)
       Y(J)=UX(J)+HX(J)
       F2P=FUNCT(Y)/FQS
       Y(I)=UX(I)
       Y(J)=UX(J)
       GS(I,J)=F2P-1.-GT(J)-GT(I)-0.5*(GS(I,I)+GS(J,J))
       GS(J,I)=GS(I,J)
  218 CONTINUE
  217  CONTINUE
  219 CONTINUE
       FQS=FQ
       RETURN
       END
C      GAUSSINVERTIERUNG DER MATRIX GG
       SUBROUTINE GAUSS(N,A)
      DOUBLE PRECISION A(17,17),PIVOT,DIFF
       DO 300 I=1,N
      DIFF=DABS(A(I,I))-0.0000001
       IF(DIFF) 300,300,216
  216  PIVOT=1./A(I,I)
       A(I,I)=PIVOT
```

```
 787  161002 KF23-1  JAHNKE      078720 FKZ=          05.02.81 V1.1804

INHALT DER DATEI ASSA1 (0001,00) IN DATENBASIS &STOD3

      DO 218 K=1,N
     L=K-I
      IF (L) 217,218,217
  217 A(I,K)=-A(I,K)*PIVOT
  218 CONTINUE
      DO 220 J=1,N
      R=I-J
      IF (R) 240,220,240
  240 DO 219 K=1,N
      M=I-K
      IF (M) 230,219,230
  230 A(J,K)=A(J,K)+A(I,K)*A(J,I)
  219 CONTINUE
      A(J,I)=A(J,I)*PIVOT
  220 CONTINUE
  222 CONTINUE
  300 CONTINUE
      RETURN
      END
C     MULTIPLIKATION DER INV. MATRIX MIT VEKTOR GR
      DOUBLE PRECISION FUNCTION UPDOT(AA,BB,I)
      INTEGER VAR
      DOUBLE PRECISION S,AA(153),BB(17)
      COMMON/UP/VAR
C     MULTIPLY BB BY THE ITH ROW OF THE SYMMETRIC MATRIX AA,
C     WHOSE UPPER TRIANGLE IS STORED BY ROWS
      K=I
      S=0
      IMM=I-1
      IF (IMM) 223,225,223
  223 DO 224J=1,IMM
      S=S+AA(K)*BB(J)
  224 K=K+VAR-J
  225 DO 226 J=I,VAR
      L=K+J-I
  226 S=S+AA(L)*BB(J)
      UPDOT=S
      RETURN
      END
C     BERECHNUNG DER FEHLERQUADRATSUMME
      DOUBLE PRECISION FUNCTION FUNCT(XU)
      INTEGER HVAR
      INTEGER TE( 80)
      REAL NY
      DOUBLE PRECISION ABWQU,DIFF
      DIMENSION XU(17),ND(3)
      COMMON /T/TNY
      COMMON/HV/HVAR,IND
      COMMON/FUN/GEMAX,IPROG,ND,PROT( 80),YTST( 80),ZTST( 80),
     -NY( 80),C( 80),GEW( 80)
      DATA ND/'0','+',' '/
      F1=79./GEMAX
      ABWQU=0.
      IF (HVAR.GT.0) GOTO 421
      WRITE(4,1049)
  421 CONTINUE
      GOTO (413,416,417),IPROG
  416 CONTINUE
      DO 415 I=1,ND
      IND=I
```

INHALT DER DATEI ASSAM (0001,00) IN DATENBASIS &STDDS

```
      BPROT=PROT(I)
      AYTOT=YTOT(I)
      CE=C(I)
      ABNY=NY(I)
      CALL SKATU (CE,XU,BPROT,ABNY,AYTOT)
       DIFF=ABNY-TNY
      ABWQU=ABWQU+GEW(I)*DIFF*DIFF
      IF (HVAR) 4037,4037,415
 4037 CONTINUE
      IF (I.GT.1) GOTO 6014
      DO 6011 K=1,80
 6011 TE(K)=ND(3)
 6014 CONTINUE
      NFF=ABNY/CE*F1+1.
      NF=TNY/CE*F1+1.
      TNYC=TNY/CE
      IF(NFF.GE.80) NFF=80
      IF(NF.GE.80)NF=80
      TE(NF)=ND(1)
      TE(NFF)=ND(2)
      ABNYC=ABNY/CE
      WRITE(4,877) ABNY,TNY,ABNYC,TNYC,(TE(L),L=1,80)
      TE(NFF)=ND(3)
      TE(NF)=ND(3)
  415 CONTINUE
      GOTO414
  417 CONTINUE
      DO 418 I=1,ND
      IND=I
      BPROT=PROT(I)
      ABNY=NY(I)
      AYTOT=YTOT(I)
      AZTOT=ZTOT(I)
      CE=C(I)
      CALL SKAIT (CE,XU,BPROT,AYTOT,AZTOT)
      DIFF=ABNY-TNY
      ABWQU=ABWQU+GEW(I)*DIFF*DIFF
      IF(HVAR) 419,419,418
  419 CONTINUE
      IF (I.GT.1) GOTO6015
      DO420 K=1,80
  420 TE(K)=ND(3)
 6015 CONTINUE
      ABNYC=ABNY/CE
      TNYC=TNY/CE
      NFF=ABNYC*F1+1.
      NF=TNYC*F1+1.
      IF (NFF.GE.80) NFF=80
      IF (NF.GE.80) NF=80
      TE(NF)=ND(1)
      TE(NFF)=ND(2)
      WRITE(4,877) ABNY,TNY,ABNYC,TNYC,(TE(L),L=1,80)
      TE(NFF)=ND(3)
      TE(NF)=ND(3)
  418 CONTINUE
      GOTO 414
  413 CONTINUE
      DO 211 I=1,ND
      IND=I
      CE=C(I)
```

INHALT DER DATEI ASSAI (0001.00) IN DATEIBASIS ESF003

```
      CALL SKAT(CE,KU)
      DIFF=NY(I)-TNY
      ABWQU=ABWQU+GEW(I)*DIFF*DIFF
      IF(HVAR) 4036,4036,211
 4036 CONTINUE
      IF (I.GT.1) GOTO6016
      DO 6012 K=1,80
 6012 TE(K)=NO(3)
 6016 CONTINUE
      TNYC=TNY/CE
      ABNY=NY(I)
      ABNYC=ABNY/CE
      NF=TNYC*F1+1.
      NFF=ABNYC*F1+1
      IF(NFF.GE.80) NFF=80
      IF(NF.GE.80) NF=80
      TE(NF)=NO(1)
      TE(NFF)=NO(2)
      WRITE(4,877) ABNY,TNY,ABNYC,TNYC,(TE(K),K=1,80)
      TE(NFF)=NO(3)
      TE(NF)=NO(3)
  211 CONTINUE
  414 CONTINUE
      IF(HVAR.GT.0) GOTO422
      WRITE(4,1050)
  422 CONTINUE
      FUNCT=ABWQU
  877 FORMAT(1X,4(E10.3,' *'),80A1)
 1049 FORMAT(//6X,'NY(I) *',4X,'TNY(I) *',5X,'NY/C *',5X,'TNY/C *',
     -/X,48('*'))
 1050 FORMAT(X,48('*'))
      RETURN
      END
C     BERECHNUNG DER THEORETISCHEN WERTE
      SUBROUTINE SKAT(CC,ZZ)
      INTEGER VAR
      DIMENSION ZZ(17)
      COMMON/IP/VAR
      COMMON/SKA/LISTE(17),Z(17)
      COMMON/T/TNY
      DO700 I=1,VAR
      J=LISTE(I)
  700 Z(J)=ZZ(I)
      ALP=(Z(8)*CC)**Z(17)
      TNY=Z(4)*ALP/(1+ALP)
      TNY=TNY+Z(3)*Z(7)*CC/(1+Z(7)*CC)
      TNY=TNY+Z(1)*Z(5)*CC/(1+Z(5)*CC)
      TNY=TNY+Z(2)*Z(6)*CC/(1+Z(6)*CC)
      RETURN
      END
C     BERECHNUNG DER THEOR. WERTE F. VERDRAENGUNG:ITERATIONSVERFAHREN
      SUBROUTINE SKATI (CC,ZZ,CPROT,AANY,AYTOT)
      INTEGER VAR,HVAR
      DIMENSION ZZ(17),BYTOT( 80)
      COMMON/IP/VAR
      COMMON/T/TNY
      COMMON/SKA/LISTE(17),Z(17)
      COMMON/HV/ HVAR,IND
      COMMON/IR/IRR
      DO700 I=1,VAR
```

```
 787  161002 KF23-1  JAHNKE        078720 F<Z=          05.J2.81 4V191803

INHALT DER DATEI ASSAM (0001,00) IN DATENBASIS &STDD3

      J=LISTE(I)
  700 Z(J)=ZZ(I)
      IF(IRR.GT.1) GOTO 9995
      BYTOT(IND)=AYTOT/(1+CPROT*(Z(1)*Z(9)+Z(2)*Z(10)+
     -Z(4)*Z(12)*Z(3)*Z(11)))
 9995 CONTINUE
      XOLD=BYTOT(IND)
 9997 CONTINUE
C     BEGINN DER ITERATIONSSCHLEIFE
      DO 99 ITER=1,99
      ITCON=2
      EA=Z(8)*CC+Z(12)*XOLD
      EB=EA**Z(17)
      QA=1.0+Z(5)*CC+Z(9)*XOLD
      QB=1.0+Z(6)*CC+Z(10)*XOLD
      QC=1.0+EB
      QD=1.0+Z(7)*CC+Z(11)*XOLD
      F1=Z(1)*Z(9)*XOLD/QA+Z(2)*Z(10)*XOLD/QB+Z(4)*Z(12)
     -*XOLD*EB/EA/QC-(AYTOT-XOLD)/CPROT
      F1=F1+Z(3)*Z(11)*XOLD/QD
      DF11=1.0/CPROT+Z(1)*Z(9)*(QA-XOLD*Z(9))/(QA*QA)+Z(2)*Z(5)*
     -(QB-XOLD*Z(10))/(QB*QB)+Z(4)*Z(12)*EB/(EA*EA)*(Z(17)*Z(12)*
     -XOLD*Z(8)*CC*QC)/(QC*QC)
      DF11=DF11+Z(3)*Z(11)*(QD-XOLD*Z(11))/(QD*QD)
      XKP1=-F1/DF11
      XOLD=XOLD+XKP1
C     TEST DER GENAUIGKEIT DER LOESUNGEN UND BEI NEGATIVEM BEFUND
C     KREATION EINES NEUEN LOESUNGSANSATZES FUER DEN FOLG. LAUF
      IF(XOLD.GT.0.)GOTO9994
      XOLD=(XOLD-XKP1)/2.
      ITCON=1
 9994 CONTINUE
      GOTO(99,9992),ITCON
 9992 EPS1=1.E-6*XOLD*XOLD
      IF(XKP1*XKP1.LE.EPS1) GOTO9991
   99 CONTINUE
      IF(HVAR) 1304,1304,1305
 1304 WRITE(4,204) IND
 1305 CONTINUE
      XOLD=BYTOT(IND)
 9991 IF (HVAR) 9990,9990,9989
 9990 WRITE(4,1257) XOLD
 9989 BYTOT(IND)=XOLD
      EA=Z(8)*CC+Z(12)*XOLD
      EB=EA**Z(17)
      QA=1+Z(5)*CC+Z(9)*XOLD
      QB=1+Z(6)*CC+Z(10)*XOLD
      QC=1+EB
      QD=1+Z(7)*CC+Z(11)*XOLD
      TNY=Z(1)*Z(5)/QA+Z(2)*Z(6)/QB+Z(4)*Z(8)*EB/EA/QC
      TNY=TNY+Z(3)*Z(7)/QD
       TNY=TNY*CC
  204 FORMAT(1H ,'   KEINE KONVERGENZ',I5)
 1257 FORMAT(1H ,'YFREI=     ',1E10.3)
      RETURN
      END
C     BERECHNUNG DER THEOR. WERTE FUER 3 DIMENSIONEN
C     NEWTON-RAPHSON-VERFAHREN
      SUBROUTINE SKAIT (CC,ZZ,CPROT,AYTOT,AZTOT)
      INTEGER VAR,HVAR
```

INHALT DER DATEI ASSA1 (0001,00) IN DATEIBASIS &SYS03

```
      DIMENSION ZZ(17),BYTOT( 80),BZTOT( 80)
      COMMON/SKA/LISTE(17),Z(17)
      COMMON/T/TNY
      COMMON/IP/VAR
      COMMON/HV/IVAR,IND
      COMMON/IR/IRR
      DO700 I=1,VAR
      J=LISTE(I)
  700 Z(J)=ZZ(I)
      IF(IRR.GT.1)GOTO 9995
      BYTOT(IND)=AYTOT/(1.+CPROT*(Z(1)*Z(9)+Z(2)*Z(10)+
     -Z(4)*Z(12)+Z(3)*Z(11)))
      BZTOT(IND)=AZTOT/(1.+CPROT*(Z(1)*Z(13)+Z(2)*Z(14)+
     -Z(4)*Z(16)+Z(3)*Z(15)))
 9995 CONTINUE
      XOLD1=BYTOT(IND)
      XOLD2=BZTOT(IND)
 9997 CONTINUE
      DO 99 ITER=1,99
      ITCON=2
      EA=Z(8)*CC+Z(12)*XOLD1+Z(16)*XOLD2
       EB=EA**Z(17)
      QA=1.+Z(5)*CC+Z(9)*XOLD1+Z(13)*XOLD2
      QB=1.+Z(6)*CC+Z(10)*XOLD1+Z(14)*XOLD2
      QC=1.+EB
      QD=1.+Z(7)*CC+Z(11)*XOLD1+Z(15)*XOLD2
      F1=Z(1)*Z(9)*XOLD1/QA+Z(2)*Z(10)*XOLD1/QB+Z(4)*
     -Z(12)*XOLD1*EB/EA/QC-(AYTOT-XOLD1)/CPROT
      F1=F1+Z(3)*Z(11)*XOLD1/QD
      F2=Z(1)*Z(13)*XOLD2/QA+Z(2)*Z(14)*XOLD2/QB+Z(4)*Z(16)*XOLD2*
     -EB/EA/QC-(AZTOT-XOLD2)/CPROT
      F2=F2+Z(3)*Z(15)*XOLD2/QD
      DF11=1./CPROT+Z(1)*Z(9)*(QA*XOLD1*Z(9))/(QA*QA)+Z(2)*Z(5)*
     -(QB-XOLD1*Z(10))/(QB*QB)+Z(4)*Z(12)*EB/(EA*EA)*(Z(17)
     -*Z(12)*XOLD1+(Z(8)*CC+Z(16)*XOLD2)*QC)/(QC*QC)
      DF11=DF11+Z(3)*Z(11)*(QD-XOLD1*Z(11))/(QD*QD)
      DF22=1./CPROT+Z(1)*Z(13)*(QA-XOLD2*Z(13))/(QA*QA)+Z(2)*Z(9)*
     -(QB-XOLD2*Z(14))/(QB*QB)+Z(4)*Z(16)*EB/(EA*EA)*(Z(17)*Z(16)*
     -XOLD2+(Z(8)*CC+Z(12)*XOLD1)*QC)/(QC*QC)
      DF22=DF22+Z(3)*Z(15)*(QD-XOLD2*Z(15))/(QD*QD)
      DF121=-Z(1)*Z(9)*Z(13)/(QA*QA)-Z(2)*Z(10)*Z(14)/(QB*QB)+
     -Z(4)*Z(12)*Z(16)*EB/(EA*EA)*(Z(17)-QC)/(QC*QC)
      DF121=DF121-Z(3)*Z(11)*Z(15)/(QD*QD)
      DF12=DF121*XOLD1
      DF21=DF121*XOLD2
      DET=DF11*DF22-DF12*DF21
      XKP1=(F2*DF12-F1*DF22)/DET
      XKP2=(F1*DF21-F2*DF11)/DET
      XOLD1=XOLD1+XKP1
      XOLD2=XOLD2+XKP2
      IF(XOLD1.GT.0.) GOTO 9994
      XOLD1=(XOLD1-XKP1)/2.
      ITCON=1
 9994 IF (XOLD2.GT.0.) GOTO 9993
      XOLD2=(XOLD2-XKP2)/2.
      ITCON=1
 9993 CONTINUE
      GOTO (99,9992),ITCON
 9992 EPS1=1.E-6*XOLD1*XOLD1
      EPS2=1.E-6*XOLD2*XOLD2
```

```
 787  161002 KF23-1  JAHNKE        078720 F<Z=          06.02.81 MV191803

INHALT DER DATEI ASSAM (0001.00) IN DATENBASIS &STDDB

      IF (XKP1*XKP1.LE.EPS1.AND.XKP2*XKP2.LE.EPS2) GOTO 9991
   99 CONTINUE
      IF (MVAR) 1304,1304,1305
 1304 WRITE(4,204) IND
 1305 XOLD1=BYTOT(IND)
      XOLD2=BZTOT(IND)
 9991 IF (MVAR) 9990,9990,9989
 9990 WRITE(4,1257)XOLD1,XOLD2
 9989 BYTOT(IND)=XOLD1
      BZTOT(IND)=XOLD2
      EA=Z(8)*CC+Z(12)*XOLD1+Z(16)*XOLD2
       EB=EA**Z(17)
       QA=1.+Z(5)*CC+Z(9)*XOLD1+Z(13)*XOLD2
      QB=1.+Z(6)*CC+Z(10)*XOLD1+Z(14)*XOLD2
      QC=1+EB
      QD=1.+Z(7)*CC+Z(11)*XOLD1+Z(15)*XOLD2
      TNY=Z(1)*Z(5)/QA+Z(2)*Z(6)/QB+Z(4)*Z(8)*EB/EA/QC
      TNY=TNY+Z(3)*Z(7)/QD
      TNY=TNY*CC
  204 FORMAT(1H ,'   KEINE KONVERGENZ',I5)
 1257 FORMAT(1H ,'YFREI=  ',E10.3,3X,'ZFREI= ',E10.3)
      RETURN
      END

ENDE DAUSGABE (14.11)  2.55
=DAUSGABE
 1 DATEI        = COMICS
 2 MODUS        = ON

START DAUSGABE (14.11)

INHALT DER DATEI COMICS (0001.00) IN DATENBASIS &STDDB

C     PROGRAM COMICS
      DIMENSION C(200),Y1(10),Y2(10),Y3(10),Y4(10),BTOT(10),
     1CLTOT(10),TX(10),VX(10),ML(10,200),MM(10,200),MN(200),
     1AL(10,200),AM(10,200),AN(200),B(200),E(200),DM(10),DMY(10),
     3KOSPNR(200)
      COMMON C,Y1,Y2,Y3,Y4,BTOT,CLTOT,TX,VX,ML,MM,MN,AL,AM,AN,NL,NM,
     1N,B,UX,IPT
    1 FORMAT(8)
   50 FORMAT(1OB)
    2 FORMAT(21I2,8X,F8.4)
   52 FORMAT(22B)
    6 FORMAT(   I3,2X,21(1X,I2),3X,F8.4)
   53 FORMAT(38)
    8 FORMAT(1OF8.4)
   54 FORMAT(2B)
    9 FORMAT(X,' TOTAL CONCN. OF METAL(',I2,4H) = ,E10.3)
   10 FORMAT(X,120('*'),//25H TOTAL CONC'N. OF LIGAND (,I2,4H) = ,E10.3)
   11 FORMAT(13X,2HC1,9X,2HC2,9X,2HC3,9X,2HC4,9X,2HC5,9X,2HC6,9X,
     12HC7,9X,2HC8,9X,2HC9,8X,3HC10)
   12 FORMAT(2I2,I3)
   17 FORMAT(F10.4,I1)
   30 FORMAT(///' PH = ',F6.3)
   33 FORMAT(6X,'L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9 L10 M1 M2 M3 M4 M5 M6
     1M7 M8 M9 M10 IN LOG.BETA',X/)
   34 FORMAT(' FREE METALS ')
   35 FORMAT(8X,10(1X,E10.3))
   36 FORMAT(' FREE LIGANDS ')
```

```
787  161002 KF23-1  JAHNKE       073720 FKZ=          06.02.81 MV191804

INHALT DER DATEI COMICS (0001,00) IN DATENBASIS GSTD18

   37 FORMAT(' COMPLEX SPECIES ')
   43 FORMAT(1X, I3,1H-,I3,10(1X,E10.3))
      READ(8,1)NJ
      NJD=0
      READ(8,53)NL,NM,N
      WRITE(4,33)
      DO 7 J=1,N
    3 READ(8,52)(AL(I,J),I=1,NL),(AM(I,J),I=1,NM),AN(J),E(J)
    7 WRITE(4,6)J,(AL(I,J),I=1,10),(AM(I,J),I=1,10),AN(J),E(J)
  106 READ(8,50)(CLTOT(I),I=1,NL)
      READ(8,50)(BTOT(I),I=1,NM)
      WRITE(4,10)(I,CLTOT(I),I=1,NL)
      WRITE(4,9)(I,BTOT(I),I=1,NM)
      HX=ALOG(10.0)
      IPT=1
      DO 4 J=1,N
      AN(J)=ANI(J)
      DO 4 I=1,10
      AL(I,J)=ALI(I,J)
    4 AM(I,J)=AMI(I,J)
      DO 13 I=1,N
   13 B(I)=EXP(HX*E(I))
      DO 14 I=1,NM
   14 Y1(I)=BTOT(I)*0.0003
      DO 15 I=1,NL
   15 Y3(I)=CLTOT(I)*0.0003
   16 READ(8,54)PH,INDEX
      WRITE(4,30)PH
      UX=EXP(HX*PH)
      IF(IPT-1)17,18,27
   18 DO 19 I=1,NM
   19 VX(I)=BTOT(I)
      DO 20 I=1,NL
      DMY(I)=1.0
      DO 22 J=1,N
      IF(AL(I,J))22,22,200
  200 DO 21 K=1,NM
      IF(AM(K,J))22,21,22
   21 CONTINUE
      DM(I)=(EXP(HX*E(J)))*UX**AN(J)
      DMY(I)=DMY(I)+DM(I)
   22 CONTINUE
   20 CONTINUE
      DO 23 I=1,NL
   23 TX(I)=CLTOT(I)/DMY(I)
   27 CALL CDGS
      WRITE(4,11)
      WRITE(4,34)
      WRITE(4,35)(VX(I),I=1,NM)
      WRITE(4,36)
      WRITE(4,35)(TX(I),I=1,NL)
      WRITE (4,37)
      KP=0
   40 KP=KP+1
      K1=10*KP
      K1=K1-9
      IF(K1-N)41,42,42
   41 WRITE(4,43)K1,K1,(C(I),I=K1,K1)
      GOTO 40
   42 WRITE(4,43)K1,N,(C(I),I=K1,N)
```

INHALT DER DATEI COMICS (0001,00) IN DATENBASIS GSTOOB

```
      IF(INDEX)31,16,31
   31 NJD=NJD+1
      IF(NJD-NJ)106,32,32
   32 STOP
      END
      SUBROUTINE CUGS
      DIMENSION TERM(200),TERN(200),C(200),Y1(10),Y2(10),Y3(10),
     1Y4(10),BTOT(10),CLTOT(10),TX(10),VX(10),AL1(10),B1(10),TY(10),
     2VY(10),ML(10,200),MM(10,200),M1(200),AL(10,200),AM(10,200),
     3AN(200),B(200)
      COMMON C,Y1,Y2,Y3,Y4,BTOT,CLTOT,TX,VX,ML,M1,MN,AL,
     1AM,AN,NL,NM,N,B,UX,IPT
   99 FORMAT(' NUMBER OF ITERATIONS = ',I4)
  998 FORMAT(' ITERATION DID NOT CONVERGE ')
      NIT=0
      DO 1 K=1,N
    1 TERM(K)=B(K)*UX**MN(K)
    2 DO 3 K=1,N
    3 TERN(K)=TERM(K)
      DO 4 K=1,N
      DO 4 J=1,NM
    4 TERN(K)=TERN(K)*VX(J)**MM(J,K)
      DO 5 K=1,N
      DO 15 J=1,NL
   15 TERN(K)=TERN(K)*TX(J)**ML(J,K)
    5 C(K)=TERN(K)
      NIT=NIT+1
      DO 7 I=1,NM
      B1(I)=VX(I)
      DO 8 K=1,N
    8 B1(I)=B1(I)+AM(I,K)*C(K)
      RATIO=B1(I)/BTOT(I)
      VY(I)=VX(I)/SQRT(RATIO)
    7 Y2(I)=ABS(B1(I)-BTOT(I))
      DO 9 I=1,NL
      AL0(I)=TX(I)
      DO 10 K=1,N
   10 AL0(I)=AL0(I)+AL(I,K)*C(K)
      RATIO=AL0(I)/CLTOT(I)
      TY(I)=TX(I)/SQRT(RATIO)
    9 Y4(I)=ABS(AL0(I)-CLTOT(I))
      IF(NIT-999)11,11,999
   11 DO 12 I=1,NM
      IF(Y1(I)-Y2(I))14,12,12
   12 CONTINUE
      DO 13 I=1,NL
      IF(Y3(I)-Y4(I))14,13,13
   13 CONTINUE
      IPT=IPT+1
      WRITE(4,99)NIT
      RETURN
   14 DO 15 I=1,NL
   16 TX(I)=TY(I)
      DO 17 I=1,NM
   17 VX(I)=VY(I)
      GOTO 2
  999 WRITE(4,998)
      IPT=1
      RETURN
      END
```

```
 787  161002 KF23-1  JAHNKE        073720 F<Z=          05.02.81 V191803

INHALT DER DATEI CUMICS (0001,00) IN DATENBASIS &STD08


ENDE DAUSGABE (14,11)  0,58
@DAUSGABE
 1 DATEI        = RATE
 2 MODUS        = JN

START DAUSGABE (14,11)

INHALT DER DATEI RATE (0001,00) IN DATENBASIS &STD08

C       PROGRAMM RATE
        DIMENSION BN(10),BK(10),BH(10),AX( 50),AS( 50),A(10)
        COMMON/PL/AN(10),AR( 50),AB( 50),AP( 50),IA,JA
       -,AK(10),AH(10)
        WRITE(9,101)
  101 FORMAT(5X' GIB ANZAHL DER DATENPAARE UND STIFTE AN! '/)
        READ(8,1)IA,JA
    1 FORMAT(2B)
        WRITE(9,102)
  102 FORMAT(5X' GIB X UND R IN VIERERREIHEN AN! '/)
        READ(8,2)(AX(I),AR(I),I=1,IA)
    2 FORMAT(4B)
        WRITE(9,103)
  103 FORMAT(5X' GIB N,K,A UND H IN DREIERREIHEN AN! '/)
        READ(8,3)(AN(J),AK(J),AH(J),J=1,JA)
    3 FORMAT(3B)
   20 DO 22 I=1,IA
        AP(I)=-ALOG10(AX(I))
        AB(I)=0.0
        DO 21 J=1,JA
        A(J)=AN(J)*(AK(J)*AX(I))**AH(J)/(1+(AK(J)*AX(I))**AH(J))
   21 AB(I)=AB(I)+A(J)
   22 CONTINUE
        RQ=0.0
        AQ=0.0
        DO 31 I=1,IA
        RQ=RQ+AR(I)
        AS(I)=(AB(I)-AR(I))**2
   31 AQ=AQ+AS(I)
        STA=SQRT(AQ/(IA-1))
        RV=RQ/IA
        VK=STA/RV
        WRITE(4,32)
        WRITE(4,35)(AX(I),AP(I),AB(I),AR(I),I=1,IA)
   32 FORMAT(/X'FREIE METALLE'7X'-ALOG 10'7X'BINDUNGSRATE',
      27X,'GEMESSEN')
   35 FORMAT(3X,E10.3,5X,F10.3,5X,F10.3,9X,F10.3,/)
        WRITE(4,33)STA,VK
   33 FORMAT(/5X' STDV.= ',E10.3,5X' VAR.= ',E10.3,)
        WRITE(4,109)
        WRITE(4,106)(AN(J),AK(J),AH(J),J=1,JA)
        CALL BJE
        IF(VK-0.05)50,50,40
   40 WRITE(4,104)
  104 FORMAT(X'DAS SIND KEINE BINDUNGSMESSUNGEN,DAS IST ZU GRAUS')
        WRITE(9,105)
  105 FORMAT(X' NOCH EIN VERSUCH =1, SONST 0 '/)
        READ(8,10) B
   10 FORMAT(B)
        IF(B.LE.0) GOTO50
```

INHALT DER DATEI RATE (0001,00) IN DATENBASIS GST)DB

```
      WRITE(9,103)
      READ(8,43)(BN(J),BK(J),BH(J),J=1,JA)
   43 FORMAT(3B)
      DO 47 J=1,JA
      AN(J)=BN(J)
      AK(J)=BK(J)
   47 AH(J)=BH(J)
      GO TO 20
   50 CONTINUE
  109 FORMAT(6X,'N',14X,'KA',13X,'H')
  106 FORMAT(10(2X,E10.3,5X,E10.3,5X,E10.3,/))
      STOP' GENEHMIGT '
      END
      SUBROUTINE BJE
      DIMENSION IZ(3),IAZ( 50,130),IAP( 50),IBZ(120)
      COMMON/PL/AN(10),AR( 50),AB( 50),AP( 50),IA,JA
     -,AK(10),AH(10)
      DATA IZ/'*',' ',' '/
      FX=20
      IAP(1)=1
      DO63 I=2,IA
      IAP(I)=INT((AP(1)-AP(I))*FX+1.)
      IF(IAP(I).NE.IAP(I-1))GOTO64
      AR(I)=(AR(I)+AR(I-1))/2.
      AR(I-1)=AR(I)
   64 CONTINUE
   63 CONTINUE
      SAN=0
      DO 60 J=1,JA
   60 SAN=SAN+AN(J)
      DO61 I=1,IA
      DO 61 K=1,120
   61 IAZ(I,K)=IZ(3)
      FY=120./SAN
      DO 62 I=1,IA
      IAR=INT(AR(I)*FY+1.)
      IAB=INT(AB(I)*FY+1.)
      IF(IAR.GE.130) IAR=130
      IAZ(I,IAB)=IZ(2)
      IAZ(I,IAR)=IZ(1)
   62 CONTINUE
      I=1
      IN=INT((AP(1)-AP(IA))*FX+1.)
      DO 70 II=1,IN
   74 IF(IAP(I)-II) 71,72,73
   71 I=I+1
      GOTO 74
   72 WRITE(4,107)(IAZ(I,K),K=1,130)
      I=I+1
      GOTO 75
   73 BAB=0
      BX=10**(-AP(1)+(II-1)/FX)
      DO 76 J=1,JA
   76 BAB=BAB+AN(J)*(AK(J)*BX)**AH(J)/(1+(AK(J)*BX)**AH(J))
      IAC=INT(BAB*FY+1.)
      DO 77 K=1,120
   77 IBZ(K)=IZ(3)
      IBZ(IAC)=IZ(2)
      WRITE(4,107)(IBZ(K),K=1,IAC)
      GOTO 75
```

INHALT DER DATEI RATE (0001.00) IN DATENBASIS &STODB

```
   75 CONTINUE
   70 CONTINUE
  107 FORMAT(X,130A1)
      RETURN
      END
```

ENDE DAUSGABE (14.11) 0.47
```
¤DAUSGABE
 1 DATEI        = SUZIE
 2 MODUS        = ON
```

START DAUSGABE (14.11)

INHALT DER DATEI SUZIE (0001.00) IN DATENBASIS &STODB

```
C      PROGRAMM S-LAUF
       DIMENSION R(20),P(20),PA(20),F(20),XP(20)
      -,SL(20),S(20),BAS(20)
       WRITE(4,10)
   10 FORMAT(X,'ANZAHL DER MESSUNGEN,OMEGA IN UPM,DELTA T IN MIN',/)
       READ(8,20) N,W,T
       WRITE(4,16)N,W,T
       WRITE(4,11)
   16 FORMAT(I1X,I4,10X,F8.1,10X,F4.1,//)
   11 FORMAT(X,'REFERENZ- UND PEAKABSTAENDE',/)
       READ(8,21)(R(I),P(I), I=1,N)
       WRITE(4,17)(R(I),P(I),I=1,N)
   20 FORMAT(3B)
   17 FORMAT(2X,F6.2,10X,F6.2)
   21 FORMAT(2B)
       DO 30 I=1,N
       F(I)=1.62/R(I)
       PA(I)=F(I)*P(I)+5.7
   30 CONTINUE
       TA=T*60.0
       WA=W*6.283/60.0
       WQ=WA**2
       DO 31 I=1,N
   31 XP(I)=ALOG(PA(I))
       SL(1)=0.0
       S(1)=0.0
       DO 32 I=2,N
       SL(I)=(XP(I)-XP(I-1))/TA
   32 S(I)=SL(I)/WQ*1.0E+13
       WRITE(4,12)
   12 FORMAT(X,/,3X,'      ',3X,'PEAK',6X,'LN PEAK'5X,'SLOPE',7X,'S',
      -/,8X,3X,'IN CM',16X,'IN LN/S',/)
       WRITE(4,13) PA(1),XP(1)
       WRITE(4,13)(       PA(I),XP(I),SL(I),S(I), I=2,N)
   13 FORMAT(X,7X,  F8.3,2X,F10.5,3X,E10.3,F8.3)
       SP=0.0
       DO 33 I=1,N
   33 SP=SP+S(I)
       SW=SP/(N-1)
       QP=0.0
       DO 34 I=2,N
   34 QP=QP+(S(I)-SW)**2
       STW=SQRT(QP/(N-2))
       VK=STW/SW
       WRITE(4,14) SW,STW,VK
```

```
 787  161002 KF23-1  JAHNKE        078720 FKZ=          06.02.81 1/171903

INHALT DER DATEI SUZIE (0001,00) IN DATEIBASIS &STDD3

   14 FORMAT(3X,'GEMITTELTER S-WERT',F8.3,3X,'STD.',F8.3,
     -3X,'VK',F6.3,/)
C     BERECHNUNG DER AUSGLEICHSGERADEN
      DO 35 I=1,N
   35 BAS(I)=TA*I
      STX=0.0
      SB=0.0
      SX=0.0
      SQX=0.0
      DO 36 I=1,N
      STX=STX+BAS(I)*XP(I)*N
      SB=SB+BAS(I)
      SX=SX+XP(I)
   36 SQX=SQX+N*BAS(I)**2
      SLA=(STX-SB*SX)/(SQX-SB*SB)
      ASS=(SX-SLA*SB)/N
      DQX=0.0
      DO50 I=1,N
   50 DQX=(ASS+SLA*BAS(I)-XP(I))**2
      DQX=DQX/(N-2)
      STDA=SQRT(DQX*N/(SQX-SB**2))
      STDA=STDA*1.0E+13/WQ
      SA=SLA/WQ*1.0E+13
      WRITE(4,15) SLA,SA,STDA
   15 FORMAT(X,'NACH AUSGLEICHSGERADE BETRAEGT DER STEIGE '
     -,E10.3,' IN LN/S',/,X,'DER S-WERT',F8.3,' +- ',E9.3,///)
      STOP  '  ...UND SIE BEWEGT SICH DOCH !  (DIE JZ)'
      END

ENDE DAUSGABE (14.11)  0.42
```

LEBENSLAUF

1o. 2.53	Geburt als zweites Kind der Eheleute Albert und Hilde Jahnke
1959 - 1963	Besuch der Grundschule Nord in Sprockhövel
1963 - 1971	Besuch des Neusprachlichen Mädchengymnasiums in Hattingen
18. 5.71	Abitur
Oktober 71	Beginn des Studiums der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
Oktober 74	Diplom-Vorprüfung in Chemie
November 77	Diplom
März 78	Beginn der Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum
3o. 6.81	Tag der mündlichen Prüfung